

Speziation von Metall-Protein-Assoziationen in Humanblut mittels multidimensionaler Trennverfahren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

von
Frank Hasenäcker
(geb.: Essen)

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Zellner

1. Gutachter: Prof. Dr. A.V. Hirner

2. Gutachter: PD Dr. W. Goedecke

Tag der Abgabe: 20.05.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2008

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich für die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Danksagung

Vor allem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A.V.Hirner sowohl für die Unterstützung bei der thematischen Auslegung dieser Arbeit als auch für die hervorragende Betreuung bedanken.

Herrn PD Dr. W. Goedecke danke ich für lehrreiche Diskussionen und seine konstruktiven Anregungen für die praktische Arbeit sowie für die Übernahme des Koreferats.

S. Wunderlich und Dr. M. Hess möchte ich für ihre freundliche Unterstützung und Beratung bei den MALDI Analysen danken.

Bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen L. Düster, M. Hitzke, J. Hippler, J. Kösters, Dr. R.A. Diaz-Bone, S. Müller, M. Madani, S. Rabieh, Dr. L. Hartmann, Frau Dr. M. Sulkowski und Herrn Dr. M. Sulkowski möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und die freundschaftliche und partnerschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während des gesamten Studiums, der Diplomarbeit und dieser Dissertation bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Analytisches Konzept.....	1
1.2 Ziel dieser Arbeit.....	3
2 Grundlagen.....	4
2.1 Multidimensionale Trennverfahren.....	4
2.2 HPLC.....	6
2.3 Size-Exclusion Chromatographie.....	8
2.4 Hydrophobe - Interaktions - Chromatographie.....	9
2.5 Anionen-/Kationenaustauscher-Chromatographie.....	10
2.6 Mischbett-Säulen.....	12
2.7 Gelelektrophorese.....	13
2.8 ICP-MS.....	15
2.9 Kollisions-/Reaktionszelle.....	16
2.10 Elementkalibration.....	18
2.11 MALDI - MS	19
2.12 Stabilität von Metallproteinen.....	20
2.12.1 HSAB-Prinzip.....	23
2.12.2 18-Elektronenregel.....	24
2.12.3 Ligandenfeldtheorie.....	26
2.12.4 Humanblut.....	28
2.12.5 Analysetechniken von Metallproteinen in biologischen Matrices.....	30
3 Methoden.....	33
3.1 Chemikalien & Gase.....	33
3.2 Instrumentelle Analytik.....	34
3.2.1 HPLC-System.....	34
3.2.2 ICP-MS.....	35
3.2.3 MALDI-TOF-MS.....	36
3.2.4 Gelelektrophorese.....	36
3.2.4.1 SDS-PAGE.....	36
3.2.4.2 CN-PAGE.....	37
3.3 Probenvorbereitung.....	38
3.3.1 HPLC.....	38

3.3.2 Proteinidentifizierung.....	39
3.4 HPLC.....	40
3.4.1 Size-Exclusion-Chromatographie.....	40
3.4.2 Präparation der Säulen	40
3.4.3 Anionenaustauscherchromatographie.....	42
3.4.4 Mischbettionenaustauscher (IEX)	42
3.4.5 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie.....	44
3.5 Mikrowellendruckaufschluß.....	44
3.6 Proteinquantifizierungen (nach Bradford, 1976).....	45
3.7 Test der enzymatischen Aktivität	45
4 Ergebnisse.....	47
4.1 Detektoroptimierung.....	47
4.2 Nativität.....	53
4.3 Konzeption 1D/2D-HPLC.....	57
4.4 2D-HPLC Optimierung.....	60
4.4.1 Size-Exclusion Chromatographie.....	60
4.4.1.1 Kalibration zur Bestimmung des Molekulargewichtes.....	60
4.4.2 Anionenaustauscherchromatographie.....	63
4.4.3 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie.....	65
4.4.4 Mischbettionenaustauscher (IEX).....	66
4.4.5 Trap-System.....	67
4.5 Elementkalibration.....	70
4.5.1 Theoretische Berechnung der Fast Gradient Calibration.....	71
4.5.2 Technische Umsetzung.....	73
4.5.3 Bestimmung des Zellvolumens.....	75
4.5.4 Validierung.....	76
4.5.5 Proteinquantifizierung.....	87
4.6 2D-HPLC an Blutplasmaproben.....	88
4.6.1 Die 10-20 kDa Fraktion.....	95
4.6.2 Die 30-50 kDa Fraktion.....	100
4.6.3 Die 110-250 kDa Fraktion.....	101
4.6.4 Die 400-600 kDa Fraktion.....	104
4.7 Metallquantifizierung.....	107
4.8 Proteinidentifizierung.....	110
4.9 HPLC-GE-Kopplung.....	114

4.9.1 HPLC-GE Interface.....	114
4.9.2 Test der enzymatischen Aktivität.....	117
5 Diskussion.....	119
5.1 Detektoroptimierung.....	119
5.2 HPLC Optimierung.....	120
5.2.1 Size-Exclusion Chromatographie.....	120
5.2.2 Anionenaustauscher.....	122
5.2.3 Mischbettionenaustauscher.....	123
5.2.4 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie.....	125
5.3 Elementquantifizierung.....	127
5.4 2D-HPLC an Blutplasmaproben.....	128
5.5 HPLC-GE Kopplung.....	131
6 Zusammenfassung.....	133
7 Ausblick.....	135
8 Literatur.....	137
9 Abkürzungen.....	149
10 Abbildungsverzeichnis.....	150
11 Tabellenverzeichnis.....	156
12 Anhang.....	157

1 Einleitung

Zum Verständnis der Einflüsse von Metallen auf den Stoffwechsel, die toxikologische Wirkung von Metallen und deren biologische Verfügbarkeit für den Organismus ist die Untersuchung von Metallproteinen und Metall-Protein Assoziationen von essentieller Bedeutung. Der Einfluss von Metallproteinen auf verschiedenste physiologische Prozesse, wie zum Beispiel der Sauerstofftransport im Blut oder der Schutz gegen oxidative Zellschäden, sind aus der Literatur^[1] bekannt. Die Analytik von Humanblut ist hierbei von besonderem Interesse, da die Speziesverteilung den Metalltransfer durch den Körper widerspiegelt und somit für diagnostische Zwecke genutzt werden kann^[2,3]. Für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen ist der Erhalt der Metall-Proteinbindung von grundlegender Bedeutung. Metall-Protein Assoziationen besitzen jedoch sehr unterschiedliche Stabilitäten. Da im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf nicht kovalent gebundene Metall-Protein-Komplexe gelegt wurde, deren Stabilität zu einem Großteil von der kinetischen Stabilisierung der Komplexzentren abhängt, ist der Einsatz von milden Analysemethoden unerlässlich. Hierdurch soll der Erhalt der Metall-Proteinbindung, der Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine sowie der Erhalt ihrer biologischen Aktivitäten während der gesamten Trennung gewährleistet werden. Der Einsatz dieser nativen Separationstechniken, welche im Vergleich zu denaturierenden Methoden eine geringere Trennleistung aufweisen, erfordert ihre Kombination und somit die Entwicklung von multidimensionalen Separationsmethoden. Hierdurch kann ein größeres Spektrum an Metall-Protein Assoziationen erfasst und die Trennleistung erhöht werden.

1.1 Analytisches Konzept

Für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen und deren Speziation wurde im Rahmen dieser und zwei weiterer Arbeiten am Institut für Umweltanalytik (Uni-Duisburg-Essen), ein analytisches Gesamtkonzept entwickelt, welches zum einen eine Isolation von unbekannten Metall-Protein Assoziationen aus Blutplasma unter nativen Bedingungen und zum anderen deren Identifizierung erlauben soll.

Die Klassische Proteinanalytik verwendet überwiegend zwei Separationstechniken, die HPLC (HPLC = High Performance oder High Pressure Liquid Chromatography) und die Gelelektrophorese (GE). Die Trennleistung dieser Systeme wird jedoch durch die Verwendung von nativen Separationsbedingungen, im Vergleich zu denaturierenden deutlich verringert.

Um diese Limitation zu reduzieren, wurde daher der Einsatz eines modular aufgebauten, multidimensionalen Trennsystems, bestehend aus einer zweidimensionalen HPLC, welche online mit einer nativen Gelelektrophorese gekoppelt werden soll, vorgesehen.

Des weiteren wird eine Minimierung der Probenvorbereitung und ein hoher Automatisierungsgrad angestrebt, um die Degeneration der Probe während der Analyse möglichst gering zu halten und einen hohen Probendurchsatz gewährleisten zu können. Die Detektion der Analyten soll hierbei zum einen mit Hilfe von zwei UV/Vis-Detektoren, welche in das HPLC-System integriert werden und zum anderen unter Verwendung der induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) erfolgen. Hierbei wird die ICP-MS sowohl in Form einer Online-Kopplung mit der HPLC als auch in Kombination mit einem Laser-Ablations-System (LA) als Offline-Kopplung zur Lokalisierung und Quantifizierung von Metall-Protein Assoziationen in Gelen eingesetzt.

Da diese Systeme nur einen geringen Teil der Geloberfläche in die ICP-MS überführen, kann nun nachfolgend eine Identifizierung der Spezies durchgeführt werden. Hierfür soll nun ein in-Gel Verdau und eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse angewendet werden. Eine schematische Zusammenfassung des angestrebten Analyseweges ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

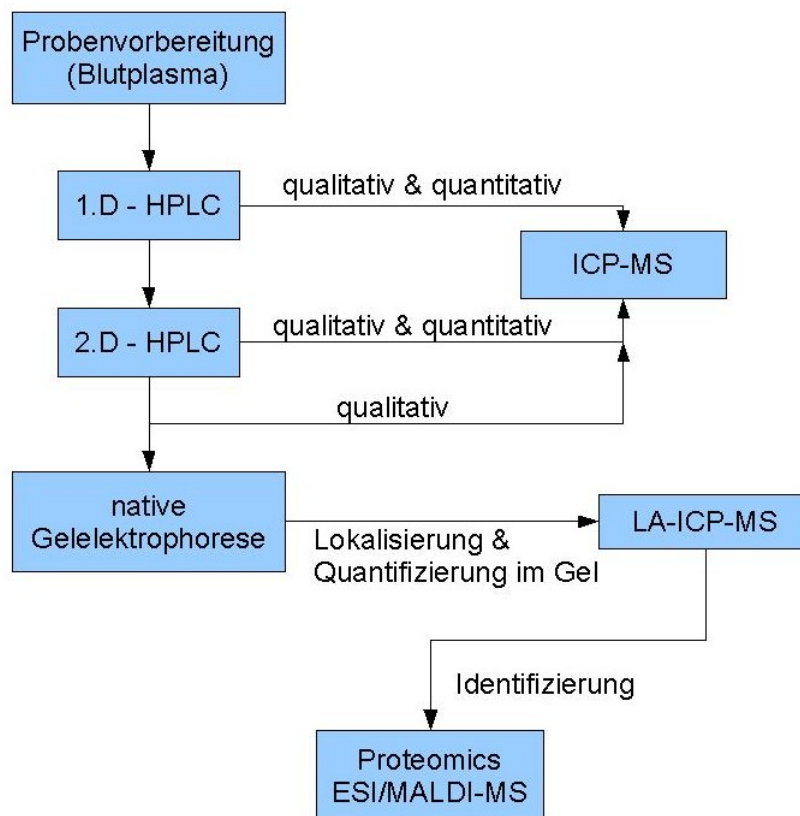


Abbildung 1.1 Analytisches Konzept zur multidimensionalen Analytik von Metall-Protein Assoziationen

1.2 Ziel dieser Arbeit

Für die Realisierung des in Kapitel 1.1 vorgestellten Konzeptes sind drei große Teilgebiete zu bearbeiten, welche sich im Bezug auf ihre analytischen Grundlagen deutlich voneinander unterscheiden. Diese Aufgabe würde den Rahmen einer einzelnen Doktorarbeit bei weitem überschreiten, daher wurden die Themengebiete aufgeteilt. Hierbei wurde die Entwicklung der Detektions- und Quantifizierungsmethode für die LA-ICP-MS von Dipl.Chem. S.Müller übernommen, wohingegen Dipl.-Ing.Chem. J.Toffel den Bereich der nativen Gelelektrophorese bearbeitet.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Validierung einer nativen zweidimensionalen HPLC-Methode, welche eine non-Target Analytik für Metall-Protein

Assoziationen ermöglicht. Diese Technik soll, insbesondere im Rahmen von Metabolismusstudien, sowohl die Detektion und Quantifizierung von gezielt eingebrachten Elementen, als auch die Beobachtung von eventuell vorhandenen induzierten Veränderungen des Metallstoffwechsels (z.B. Austauschreaktionen mit essentiellen Elementen), ermöglichen. Hierzu wurde zunächst eine Optimierung der Elementdetektion, mit Hilfe der Kollisions-/Reaktionszelle der ICP-MS angestrebt, welche eine effektive Reduktion von isobaren molekularen Interferenzen erlaubt und die Möglichkeit zur Analyse von Heteroelementen, wie Phosphor und Schwefel ermöglicht. Als Vorarbeiten zur Optimierung der Chromatographietechniken musste der Einfluss von Detergenzien, wie EDTA und SDS, untersucht werden. Aufgrund der Komplexität von biologischen Proben soll hiernach zunächst eine eindimensionale Optimierung der einzelnen Trenndimensionen anhand von Blutplasma erfolgen. Anschließend werden diese optimierten Trenntechniken zu einem mehrdimensionalen HPLC-System zusammengeführt. Die Komplexität des hierbei entstandenen automatisierten HPLC-Systems erforderte weiterhin, eine neue externe Quantifizierungsmethode, welche Metallkontaminationen des HPLC-Systems vermeidet.

Neben der Gewinnung von Elementinformationen mit Hilfe der anorganischen Massenspektrometrie wurde die MALDI (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) Technik für die Proteinidentifizierung nach mehrdimensionaler Separation eingesetzt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen konnten hierbei in Kooperation mit Dipl.Chem. S.Wunderlich (Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt werden.

Für die Realisierung einer Online-Kopplung der HPLC mit der Gelelektrophorese wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing.Chem. J.Toffel ein Interface, welches den Probentransfer zwischen den beiden Systemen ermöglicht, entwickelt.

2 Grundlagen

2.1 *Multidimensionale Trennverfahren*

Bei der Analyse von komplexen biologischen Proben wie zum Beispiel Blutplasma oder Zellextrakten ist die Trennleistung einer einzelnen Separationstechnik häufig nicht ausreichend um eine Reinheit der Analyten zu erzielen, welche für die jeweilige Fragestellung erforderlich ist.

Die Analytik von Metall-Protein Assoziationen, deren Stabilität zu einem Großteil von der kinetischen Stabilisierung der Komplexzentren abhängt, erfordert zusätzlich native Separationsbedingungen, welche den Erhalt der Tertiärstruktur der Proteine und ihrer biologischen Aktivität während der gesamten Trennung gewährleisten. Diese Techniken besitzen im Vergleich zu denaturierenden Verfahren eine geringere Trennleistung (Abbildung 2.1). Um eine Erhöhung der Trennkapazität zu erreichen ist daher die Verkettung von unterschiedlichen Trennmethoden erforderlich. Diese mehrdimensionalen Trennverfahren setzen sich aus der Kombination von mindestens zwei Separationsschritten, welche auf unterschiedlichen Trennprinzipien beruhen^[4,5], zusammen. Hierbei sind sowohl mehrdimensionale gaschromatographische^[6] als auch flüssigkeitschromatographische^[7-16] Techniken bekannt. Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht über die am häufigsten in der Bioanalytik eingesetzten Trennmethoden und ihre Trennkapazität.

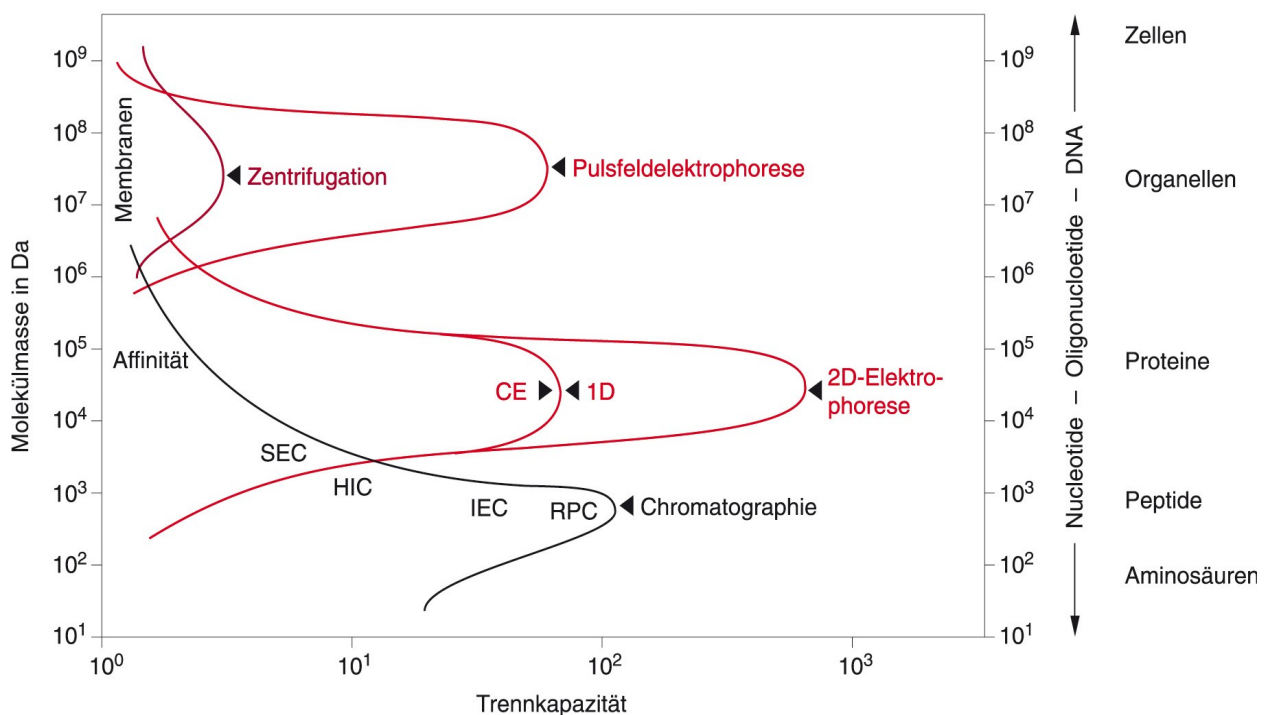


Abbildung 2.1 Übersicht Trennsysteme und Trennleistung in der Proteinanalytik [17]

In der Proteinanalytik ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE), welche häufig als Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese eingesetzt wird ^[18], eine der leistungsstärksten Separationsmethoden (Abbildung 2.1). Neben dieser etablierten Technik finden flüssigkeitschromatographische Systeme, bei welchen häufig schonende Trennschritte, wie die Size-Exclusion (Größenausschluß) Chromatographie oder die Ionenaustauscherchromatographie mit Reversed Phase (Umkehrphasen) Methoden kombiniert^[19] werden, ihren Anwendungsbereich. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese ist hierbei eine direkte Kopplung der Anlage mit massenspektrometrischen Detektoren, welche sowohl Elementinformationen (ICP-MS) ^[20] als auch Molekülinformationen (ESI/APCI-MS) ^[17,18,12] liefern können möglich. Die Verknüpfung der unterschiedlichen Separationsmethoden kann hierbei sowohl offline als auch online erfolgen. Bei der offline Kopplung wird die Probe nach dem ersten Trennschritt fraktioniert. Anschließend erfolgt eine erneute Probenaufgabe der Fraktionen auf die nachfolgende Trenndimension ^[17-19,21].

Online gekoppelte multidimensionale Systeme hingegen realisieren den Proben transfer automatisiert und ohne dass die Probe das Analysesystem verlässt. Hierdurch wird die Probe vollständig auf die zweite Trenndimension überführt. Die Fraktionierung vor dem zweiten Separationsschritt, welche erforderlich ist, um Rückvermischungen des Analyten und somit den Verlust von Trennkapazität zu vermeiden, kann bei flüssigkeitschromatographischen Systemen (LC-Systemen) durch die Verwendung eines separaten und der Trennsäule vorgeschalteten Trap-Systems realisiert werden ^[11,21]. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von mehreren Trennsäulen ^[9,21] auf welchen der Eluent der ersten Dimension fraktioniert werden kann. Mehrdimensionale HPLC-Systeme kombinieren in der Regel zwei Separationsschritte; wenn nachfolgend weitere Aufarbeitungsschritte erforderlich sind, werden diese häufig offline durchgeführt. Aufgrund der anspruchsvollen Steuerungstechnik und der erforderlichen Hardware sind online gekoppelte mehrdimensionale HPLC-Systeme zur Zeit nicht kommerziell erhältlich und werden daher nur selten in der Routineanalytik eingesetzt.

2.2 HPLC

Die HPLC (High Performance oder High Pressure Liquid Chromatography) ist die am häufigsten eingesetzte Form der modernen Flüssigkeitschromatographie ^[18,19,21]. Die Trennung basiert auf physikalischen Effekten, mit welchen die Stofftrennung durch die Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erreicht wird. Prinzipiell unterscheidet man zwischen Adsorptions- und Verteilungschromatographie. Bei der Adsorptionschromatographie erfolgt die Trennung durch Adsorption an einer stationären Phase. Wird die Stofftrennung durch den Lösevorgang in der stationären und mobilen Phase bestimmt, spricht man von Verteilungschromatographie. Die HPLC wurde in den 60er Jahren aus der klassischen Säulenchromatographie entwickelt. Da die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase steigt, was einer Zunahme der theoretischen Böden gleichkommt, bestehen HPLC Säulen aus sehr feinem Material. Durch das feine

Säulenmaterial erfordert die HPLC erhöhte Drücke (bis 400 bar), um die Trennung in einem realistischen Zeitrahmen durchführen zu können.

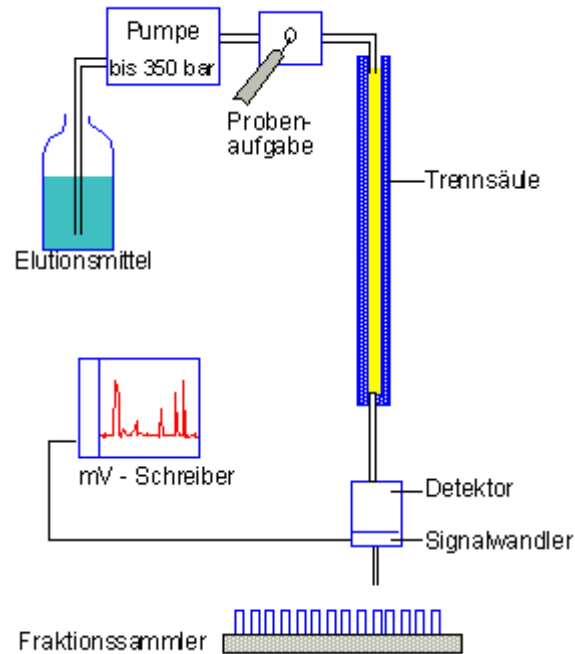


Abbildung 2.2 schematische Darstellung einer HPLC - Apparatur [22]

Eine HPLC-Apparatur (Abbildung 2.2)^[22] besteht aus einer Gradientenpumpe mit Laufmittelreservoir, dem Probenaufgabesystem, der Trennsäule und einem Detektor mit Datenausgabe. Die Trennsäulen sind in der Regel zwischen 5 und 100 cm lang mit einem Innendurchmesser von 1–25 mm. Als Füllmaterial wird häufig Kieselgel oder ähnlich poröses Material verwendet, welches mit funktionellen Gruppen modifiziert sein kann. Abhängig vom Füllmaterial und von der Säulenlänge können HPLC Säulen bis zu 65000 theoretische Trennböden aufweisen^[22]. Die Elution kann im einfachsten Fall mit einem Lösungsmittel oder einem konstanten Lösungsmittelgemisch isokratisch erfolgen. Bei schwierigeren Trennproblemen wird hingegen ein Lösungsmittelgradient verwendet. Das Laufmittelgemisch kann niederdruckseitig mit einem Gradientenmischer und einer Pumpe gemischt werden. Bei einer hochdruckseitigen Mischung benötigt man mindestens zwei Pumpen. Als Detektor wird häufig ein UV-Detektor eingesetzt. Je nach Problemstellung können auch andere Detektoren wie Refraktationsindex-, Fluoreszenz-, Leitfähigkeitsdetektoren oder ein Massenspektrometer verwendet werden.

2.3 Size-Exclusion Chromatographie

Die Size-Exclusion Chromatographie (Größenausschlußchromatographie) oder Gelfiltration ist eine Spezialform der Flüssigkeitschromatographie, bei der Proteine nach ihrem hydrodynamischen Querschnitt aufgetrennt werden ^[18,19]. Dieses entspricht annähernd der molekularen Größe der Analyten. Bei einer SEC-Säule besteht die stationäre Phase aus „Perlen“ mit einem heteroporösen gequollenen Netzwerk, dessen Porengrößenverteilung über mehrere Nanometer variiert, so dass eine Fraktionierung abhängig von der Molekulargröße (Molekularsieb-Effekt) erfolgt ^[18,19].

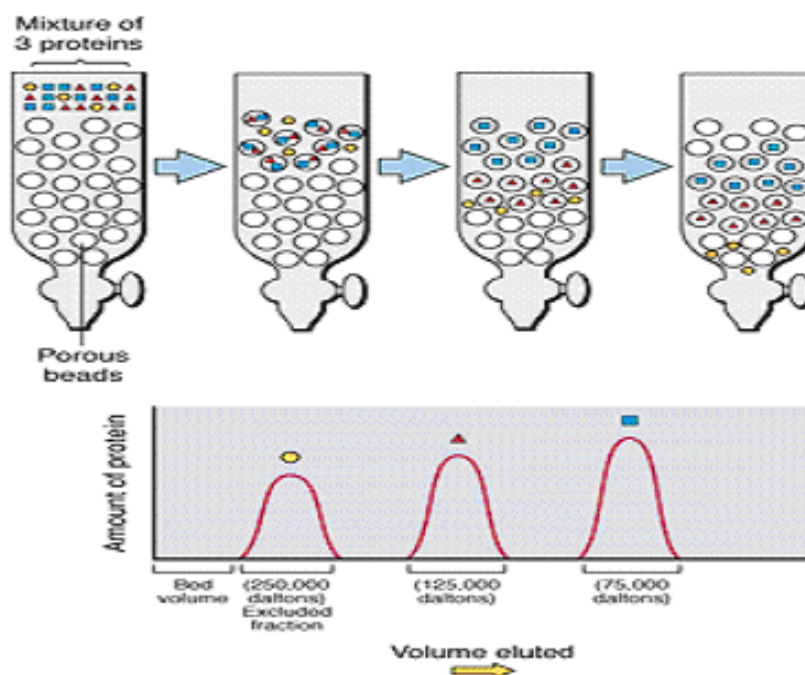


Abbildung 2.3 Funktionsweise der Size-Exclusion Chromatographie [23]

Gibt man eine flüssige Phase mit dem gelösten Protein auf die Säule, können die Proteine nur in den Teil des Füllmaterials eindringen (Abbildung 2.3)^[23], der ihnen auf Grund ihrer Größe zugänglich ist. Folglich dringen die kleineren Moleküle tiefer ein und werden länger in der Säule zurückgehalten als die größeren Moleküle. Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen

Gels, können die „Gelkörner“ nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei, was zu einer kurzen Retentionszeit führt. Die Proteine verlassen die Säule in der Reihenfolge abnehmender molekularer Größe. Das Säulenmaterial besteht häufig aus Dextran, Agarose, Tricorn und anderen modifizierten Polysacchariden ^[22]. Des weiteren können Kieselgele, Poly-ethylenglykoldimethylacrylat, mit Divinylbenzol vernetzte Styrolgele, poröses Glas und Polyacrylamide als Füllmaterial verwendet werden. Nach einer Kalibration liefert die Size-Exclusion Chromatographie neben einer Proteintrennung Informationen über die molaren Massen der Analyten und die Größenverteilung der Proteine in der Probe.

2.4 Hydrophobe - Interaktions - Chromatographie

Die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) ist eine milde Separationstechnik für die Proteinanalytik. Das Trennprinzip beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und hydrophoben Bereichen der Proteine ^[18] (Abbildung 2.4).

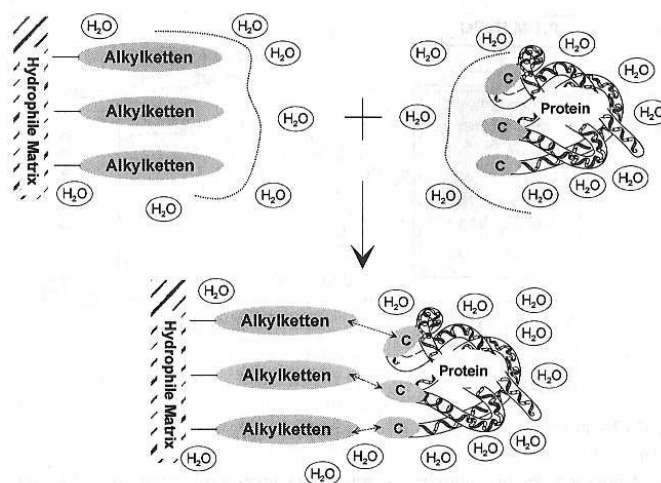


Abbildung 2.4 Funktionsweise der hydrophoben Interaktions-Chromatographie [18]

Das Assoziationsbestreben und damit die Stärke der Wechselwirkungen ist von der Hydratisierung der Proteine und der Säulenmatrix abhängig. Die Hydratisierung kann durch Salzzusätze beeinflusst werden, da einige Ionen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Trennphase und den Proteinen stabilisieren und verstärken. Andererseits haben sie die Eigenschaft, hydrophobe Wechselwirkungen zu verringern ^[18]. Tabelle 2.1 ^[18,24] zeigt einen Ausschnitt der Hofmeister Serie, in welcher die wichtigsten Anionen und Kationen hinsichtlich aufsteigender Affinität für hydrophobe Wechselwirkungen geordnet sind. Durch den Einsatz von geeigneten Salzgradienten kann die Trennung somit für das jeweilige Trennproblem optimiert werden.

Tabelle 2.1 Hofmeister Serie [18,24]

zunehmende Affinität für hydrophobe Wechselwirkungen =>									
Kationen	Ba ₂ ⁺	Ca ₂ ⁺	Mg ₂ ⁺	Li ⁺	Cs ⁺	Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	NH ₄ ⁺
Anionen	SCN ⁻	I ⁻	ClO ₄ ⁻	NO ₃ ⁻	Br ⁻	Cl ⁻	CH ₃ COO ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻

Das Säulenmaterial besteht meist aus weitporigen Polymer-Materialien mit gebundenen schwach hydrophoben Substituenten wie Butyl-, Phenyl- oder Oktylgruppen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Reversed-Phase Materialien, welche zu hydrophob sind um Proteine in wässrigen Phasen eluieren zu können, ermöglichen HIC-Materialien eine native Proteintrennung.

2.5 Anionen-/Kationenaustauscher-Chromatographie

In der Ionenaustauscherchromatographie werden stationäre Phasen eingesetzt, welche mit ionischen Gruppen funktionalisiert wurden. Als Basismaterial werden häufig Polymere oder Silicagele eingesetzt. Prinzipiell unterscheidet man zwischen Anionen- und Kationenaustauschern. Anionenaustauschermaterial wird mit kationischen Gruppen wie R-NH_3^+ , NR_4^+ und R-NH_2 funktionalisiert, wohingegen Kationenaustauscher mit anionischen Gruppen wie R-SO_3^- oder R-COO^- ausgestattet werden.

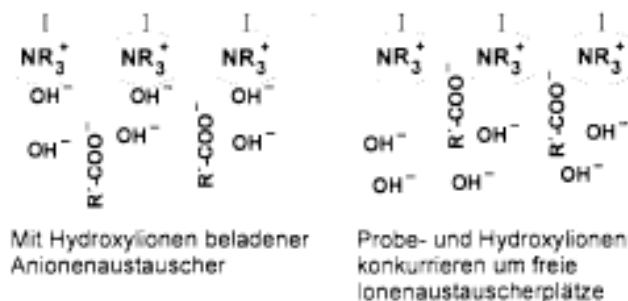


Abbildung 2.5 Funktionsweise der Ionenaustauscher Chromatographie [18]

Die Ladungen der stationären Phase werden durch mobile Gegenionen besetzt (Abbildung 2.5) ^[18,19,21]. Diese können gegen ionische Analyten ausgetauscht werden. Die Trennung einer Probe erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Ionenstärke und Ladung der im Probengemisch vorhandenen Analyten. Durch den Einsatz von Salz- oder pH-Gradienten (Abbildung 2.6) kann die Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase beeinflusst werden, was eine Optimierung der Separation ermöglicht.

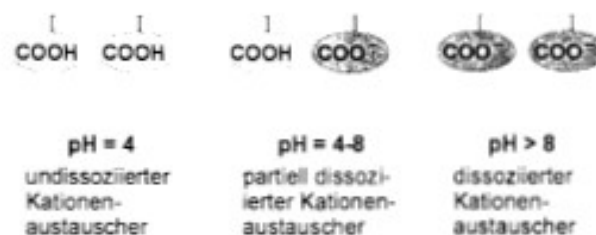


Abbildung 2.6 pH-Abhängigkeit der Ionenaustauscher Chromatographie [18]

2.6 Mischbett-Säulen

Mischbett-Säulen kombinieren mindesten zwei unterschiedliche Trennsysteme (z.B. RP & NP) in einer Trennsäule, wodurch die Vorteile beider Methoden zur Optimierung der Trennleistung genutzt werden. Diese Technik ist sowohl in der Gaschromatographie ^[26] als auch in der Flüssigkeitschromatographie ^[27] anwendbar. Sie wird überwiegend zur Separation von sehr komplexen Proben eingesetzt ^[26-28], da hierbei die Trennleistung einer einzelnen Säule nicht ausreichend ist. Des weiteren eröffnet die Verwendung von Mischbett-Säulen die Möglichkeit gute Trennleistungen mit klein dimensionierten Säulen und somit schnelle Chromatographieläufe durchführen zu können. Dies ist besonders für die zweite Trenndimension eines mehrdimensionalen Systems vorteilhaft. Um zwei Trennsysteme in einer Säule vereinen zu können, gibt es in der Flüssigkeitschromatographie prinzipiell zwei Wege: Zum einen kann das Säulenmaterial mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen belegt werden, zum anderen besteht die Möglichkeit verschieden funktionalisierte Partikel miteinander zu mischen. Die Kombinationsmöglichkeiten der Trennsysteme werden durch die Kompatibilität der mobilen Phasen und des Säulenmaterials oder durch die Funktionalisierbarkeit der stationären Phase limitiert. In der Flüssigkeitschromatographie werden häufig Kombinationen aus SEC und HIC oder RP und NP verwendet, wobei sich die Darstellung der Trennsäulen unterschiedlich gestaltet, die SEC/HIC-Systeme entstehen durch die Funktionalisierung von SEC-Material mit hydrophoben Substituenten (siehe Kapittel 2.4) . Im Gegensatz hierzu bestehen RP/NP-Säulen oft aus Mischungen der entsprechenden Partikel.

Die Retention auf Mischbettsystemen ergibt sich aus der Summe der individuellen Beiträge der verwendeten Trenntechniken ^[26-28].

$$V_R = m_A \cdot V_{R(A)} + m_B \cdot V_{R(B)}$$

Gleichung 1

Gleichung 1 beschreibt das spezifische Retentionsvolumen (V_R) eines Analyten in einem Mischbettsystem, welches in Abhängigkeit von den Massenanteilen (m_A und m_B) der Einzelkomponenten sowie den spezifischen Retentionsvolumina auf den jeweiligen Reinphasen Säulen ($V_{R(A)}$ und $V_{R(B)}$) bei konstanten Eluenten berechnet werden kann. Aufgrund der Linearität der Beziehungen kann durch die Auftragung der Retentionszeiten der Analyten, welche mit zwei unterschiedlichen Mischverhältnissen oder den Reinkomponenten Säulen ermittelt wurde, gegen das Mischungsverhältnis, eine Extrapolation der Retentionszeiten erfolgen. Durch die Anpassung der Anteile der beteiligten Trenntechniken in einer Säule kann die Trennleistung von Mischbettsystemen nun für das Trennproblem optimiert werden.

2.7 Gelelektrophorese

Neben den flüssigkeitschromatographischen Trenntechniken ist die Gelelektrophorese (GE) die am weitesten verbreitetste Separationstechnik in der Proteinanalytik. Die Auftrennung des ionischen Analyten erfolgt hierbei elektrophoretisch in einer Gelmatrix. Hierbei wandern die Proteine je nach Ladung in Richtung Anode oder Kathode durch das Gel. Die Trennung erfolgt auf Grund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität, welche bei nativen Gelen überwiegend vom Masse/Ladungsverhältnis (m/z) abhängt und durch den pH-Wert der Umgebung beeinflusst werden kann^[17,18,23].

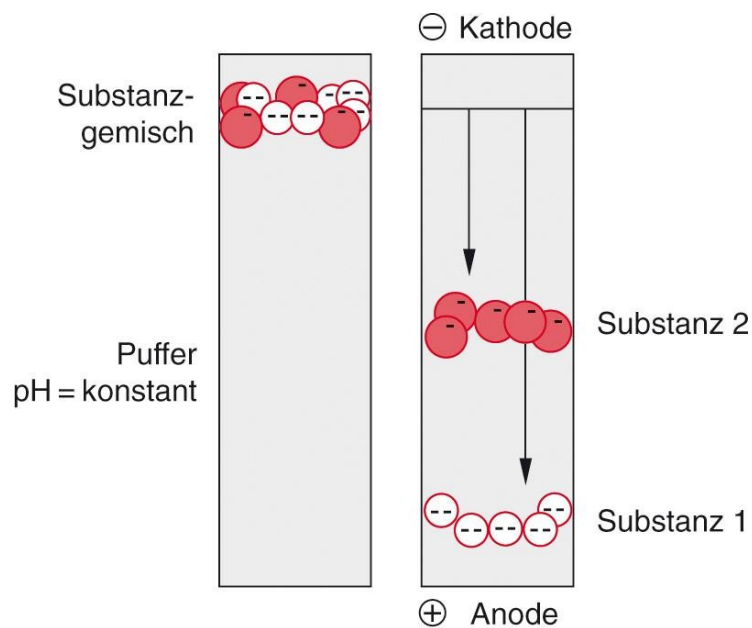


Abbildung 2.7 Funktionsprinzip der Gelelektrophorese [17]

Ein Spezialfall der Gelelektrophorese ist die SDS (= Natriumdodecylsulfat) Elektrophorese. Hierbei werden die m/z Verhältnisse durch die Zugabe von SDS äquilibriert, da sich ein SDS-Molekül, welches als Ladungsträger fungiert, stöchiometrisch an zwei Aminosäurereste des Proteins anlagert. Die resultierende elektrophoretische Mobilität und somit die Separation wird daher nur noch von der Masse des Analyten beeinflusst.

Je nach Anwendungsbereich bestehen die Gele aus Agarose, welche hauptsächlich zur Aufreinigung von DNA oder RNA verwendet wird, oder aus Polyacrylamid welches häufig für die Proteinaufreinigung eingesetzt wird ^[29-31].

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), welche sowohl nativ ^[32] als auch als SDS-Variante angewendet werden kann, ermöglicht durch die Varianz der Polyacrylamidkonzentration die Erzeugung von Gelen mit verschiedensten Porengrößen. Die Porengrößen und somit die Trennleistung und der Trennbereich des Gels kann weiterhin durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid, welches den Vernetzungsgrad bestimmt, beeinflusst werden. Des weiteren ist die Produktion von Polyacrylamidgradienten möglich. Hierbei wird eine Variation der Porengröße in Laufrichtung des Gels erzeugt, was eine optimale Anpassung der Gele an das Trennproblem erlaubt.

2.8 ICP-MS

Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS = Inductively - Coupled - Plasma Mass - Spectrometry) ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Elementen in relativ kurzer Zeit und ist aufgrund ihrer Nachweisstärke und Multielementfähigkeit eines der meist genutzten Verfahren der Spurenelementanalytik. Ursprünglich war die ICP-MS eine Methode zur Analyse von Lösungen und Gasen. Durch die Kopplung mit einem Laser-Ablations System kann auch eine direkte Analyse von Festkörpern durchgeführt werden.

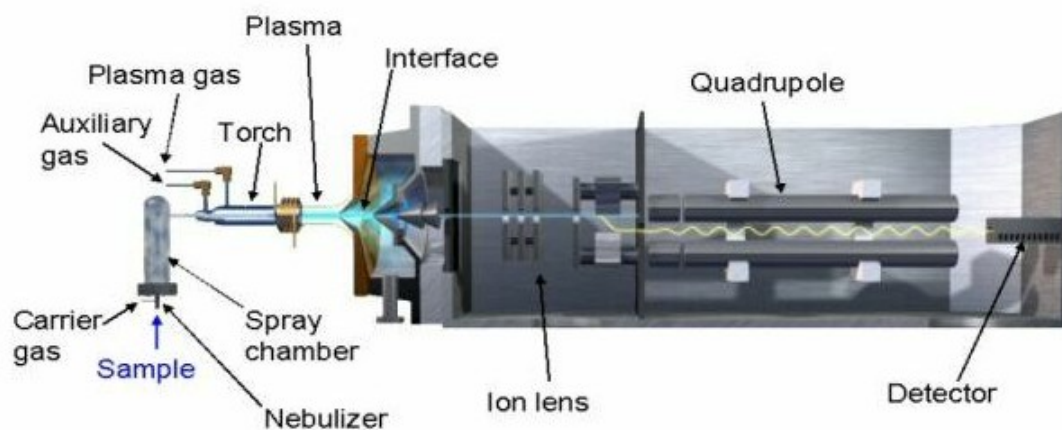


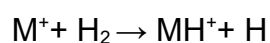
Abbildung 2.8 Aufbau einer ICP-MS [33]

Die ICP-MS beruht auf der Atomisierung und anschließenden Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 8000 K. Zur Erzeugung des Plasmas wird ionisiertes Argon im hochfrequenten elektrischen Feld zum Schwingen angeregt. Aus diesem Plasma werden die Ionen durch zwei Blenden, die als Sampler und Skimmer bezeichnet werden, in das Vakuum-System des Massenspektrometers überführt (Abbildung 2.8) ^[33]. Nach der Fokussierung in der Ionenoptik wird der Ionenstrahl im eigentlichen Massenspektrometer in Ionen unterschiedlicher Masse getrennt. Jedes Element besitzt mindestens ein Isotop, dessen Masse bei keinem natürlichen Isotop eines

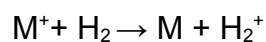
anderen Elements auftritt. Somit ist die Masse eine charakteristische Eigenschaft des jeweiligen Elements. Dies wird sowohl zum qualitativen als auch zum quantitativen Nachweis genutzt. Darüber hinaus ist die Bestimmung von Isotopenverhältnissen möglich. Bei den heute üblichen ICP-MS Geräten werden nach der Massentrennung einzelne Ionen detektiert, so dass sehr geringe Mengen eines Elements nachgewiesen werden können. Einschränkungen ergeben sich durch gerätespezifisches Untergrundrauschen und massenspezifische Interferenzen.

2.9 Kollisions-/Reaktionszelle

Isobare Interferenzen, bei denen mindestens ein Molekül beteiligt ist, können durch den Einsatz einer Kollisions-/Reaktionszelle minimiert werden. Durch Zugabe von Gasen wie Wasserstoff oder Helium werden diese Störionen aus der ionisierten Probe umgewandelt. Der Wasserstoffmodus eignet sich zur Reduktion von Störungen, welche durch intensive Massensignale von Molekülionen wie CO^+ , N_2^+ , Ar^+ , Ar_2^+ oder ArO^+ verursacht werden und den Untergrund für Elemente wie ^{40}Ca oder ^{56}Fe stark anheben. Reaktionsgase wie zum Beispiel Wasserstoff reagieren mit den Molekülionen, wobei vorwiegend zwei exotherme Reaktionen auftreten ^[34]. Zum einen kann ein Wasserstofftransfer stattfinden:



Des weiteren ist ein Ladungsaustausch möglich:

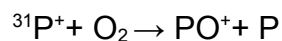
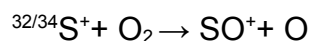


Beide Reaktionen führen zur Entfernung der störenden Molekülionen.

Der Heliummodus hingegen ermöglicht es, viele Molekülionen wie ArO^+ (Masse 56) oder O_2^+ (Masse 32) durch Stöße mit dem Kollisionsgas zu entfernen, da die Molekülionen

aufgrund ihres größeren Stoßquerschnitts häufiger mit dem Kollisionsgas zusammenstoßen, als Elementionen der selben Masse. Durch diese Stöße verlieren sie Energie und können die Potentialbarriere ^[34] am Eingang des Quadrupols nicht mehr überwinden und werden somit herausgefiltert. Dieser Modus ist besonders für organische Proben, welche häufig in unbekannten oder sehr verunreinigten Matrices vorliegen, geeignet.

Für die Analyse von Metall-Protein Assoziationen ist die Detektion von Heteroelementen wie Phosphor und Schwefel besonders interessant, da sie in Kombination mit Metalldaten Einblicke in die Stöchiometrie ermöglichen. Die Massen dieser Elemente sind bei der Flüssigaufgabe insbesondere aus wässrigen Medien besonders stark durch isobare molekulare Interferenzen gestört. Zur Reduktion dieser Störungen können zum einen Kollisionsgase wie Helium oder Xenon verwendet werden. Eine weitere Strategie, bei welcher gezielt Molekülonen produziert werden, welche nun anstelle der interferierten Elementionen analysiert werden können, verwendet Sauerstoff als Reaktionsgas:



Die Bildung der Oxide ist bei Phosphor ($\Delta H = -298$ kJ/mol) und Schwefel ($\Delta H = -26$ kJ/mol) durch die Bildungsenthalpie thermodynamisch begünstigt ^[35].

Der Einsatz von Reaktions-/Kollisionsgasen führt in der Regel zur Senkung der Sensitivität der Analyten, da sich die Reaktionen, beziehungsweise die Stöße zwischen der Probe und den Reaktions-/Kollisionsgas, nicht ausschließlich auf die unerwünschten Molekülonen beschränken. Das Signal-Rausch Verhältnis wird dagegen durch die Reduktion von Störionen beim Einsatz der Kollisions-/Reaktionszelle deutlich verbessert.

2.10 Elementkalibration

Für die quantitative Bestimmung von Analyten mit den Mitteln der instrumentellen Analytik ist die Kalibration von Messsignalen von entscheidender Bedeutung. Hierzu wird das Signal der Probe mit Signalen von definierten Standards oder Referenzmaterialien verglichen. Die exakte Technik ist hierbei vom verwendeten Detektor und jeweiligem analytischen Problem abhängig. Für die Kalibration der ICP-MS werden etablierte Methoden, wie die externe und interne Kalibration, sowie die Standard Addition und die Isotopenverdünnung eingesetzt^[36-40].

Für die externe und interne Kalibration, welche sowohl quantitative als auch semiquantitative Bestimmungen erlauben, sind matrixangepasste Standards mit identischen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie der Analyt sie aufweist erforderlich^[38]. Bei der externen Kalibration werden häufig Verdünnungsreihen oder Einzelpunkt Kalibrationen verwendet. Im Gegensatz hierzu zeichnet sich die interne Kalibration dadurch aus, dass jede Probe mit der gleichen Menge einer Substanz versetzt wird, was die Korrektur von Gerätevarianzen erlaubt und in Kombination mit der externen Kalibration deren Präzision deutlich verbessert. Des weiteren kann die interne Kalibration zur Interelementkalibration^[42] eingesetzt werden. Hierdurch wird eine semiquantitative Bestimmung ermöglicht, auch wenn kein geeigneter Standard verfügbar ist.

Die Standard Addition wird häufig für die Analytik von Proben mit komplexer Matrix eingesetzt, da diese Technik eine gute Korrektur von Matrixeffekten erlaubt. Hierzu werden mindestens zwei Aliquote der Probe mit unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten versetzt und vermessen. Die Auswertung erfolgt durch die Erstellung einer Kalibrationsgerade, deren y-Abschnitt nach Extrapolation die Konzentration der Probe liefert. Dieses Verfahren ist nur für die Kalibration von linearen Detektoren verwendbar^[38-40] und die Verfügbarkeit von geeigneten Standards muss gewährleistet sein.

Eine weitere wichtige Kalibrationstechnik ist die Isotopenverdünnung. Die Proben werden zur Quantifizierung mit einer bekannten Menge an isotopenangereichertem Standard versetzt. Durch die Analyse des so entstandenen Isotopenverhältnisses in der Probe und dem Vergleich mit dem natürlichen Isotopenverhältnis kann der Analyt quantifiziert werden^[38-41]. Elemente wie Arsen und Bismut, welche als

Monoisotope vorkommen, können nicht mit dieser Technik bestimmt werden.

Alle aufgeführten Techniken eignen sich für die Kalibration der ICP-MS und können sowohl bei der Direktinjektion als auch für die Kopplung des Massenspektrometers mit vorgeschalteten Trennsystemen eingesetzt werden^[38-41,43].

2.11 MALDI - MS

Für die Identifizierung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes oder eines charakteristischen Fragmentogrammes nach vorherigem enzymatischen Verdau ist eine schonende Ionisierung der Proben, welche die ICP-MS nicht leisten kann, erforderlich. Daher wurde die MALDI Technik (MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), welche in den 1980er Jahren von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka entwickelt wurde^[17,44], eingesetzt. Hierzu wird die Probe in eine UV-absorbierende Matrix wie zum Beispiel 2,5-Dihydrobenzoesäure (DHB) oder Sinapinsäure eingebettet. Die Einbettung kann entweder durch direktes Vermischen der Probe mit der Matrix und anschließende Kristallisation erfolgen oder durch Aufsprühen der Matrix auf einen zuvor auf einem Probenträger fixierten Analyten^[17,18,22]. Die Wahl der geeigneten Matrix ist hierbei vom Analyten abhängig und erfolgt bei unbekannten Proben in der Regel aufgrund von empirischen Messungen. Durch den Beschuss des so entstandenen Kristalls im Hochvakuumbereich des Massenspektrometers mit einem UV-Laser wird die Matrix energetisch angeregt. Dies führt zu einem Protonentransfer von den Matrixmolekülen auf die Probe und gleichzeitig einem Übergang der Probe und der Matrix in die Gasphase^[17,22]. Die Massenselektion erfolgt am häufigsten mit einem Flugzeitmassenanalysator (TOF = Time Of Flight), da hierbei eine hohe Massengenauigkeit erzielt werden kann. Durch den MALDI-Prozess entstehen überwiegend einfach oder doppelt geladene Ionen, was die Interpretation der MALDI-Spektren im Gegensatz zu ESI (ESI = Elektrospray Ionisation) vereinfacht. MALDI-Massenspektrometer werden daher häufig für die Proteinidentifizierung verwendet^[17,18,22,44].

2.12 Stabilität von Metallproteinen

Metallproteine sind Proteine, welche koordinativ oder kovalent gebundene Metalle enthalten. Zu den Metallproteinen gehören sowohl zahlreiche Metallenzyme (1/3 aller bekannten Enzyme sind Metallproteine^[24]) als auch Transport- und Speicherproteine wie zum Beispiel Ferritin. Im Bereich der kovalent gebundenen Spezies sind vorwiegend Selenoproteine untersucht worden. Des weiteren bilden Metallthionine, welche verschiedenste Metalle über den Schwefel ihrer Cysteingruppen^[45] (Abbildung 2.9) binden, häufig kovalente Bindungen zu den Metallen aus. Ihre stabilsten Vertreter sind Selen, Arsen oder Quecksilber Metallthionine. Die Koordinationsverbindungen der Metallproteine sind in der Regel thermodynamisch stabile aber kinetisch labile Komplexverbindungen mit den Koordinationszahlen 4 und 6. Dabei können die Metalle über verschiedene elektronenreiche Gruppen der Proteine an diese gebunden werden. Abbildung 2.9 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Aminosäuren und deren Bindungsmöglichkeiten an Metallionen. Neben der Bindung über das freie Elektronenpaar des Stickstoffs können Komplexverbindungen über Carboxylgruppen, Thiolatgruppen oder Phenolatgruppen (Abbildung 2.9) ^[45] ausgebildet werden.

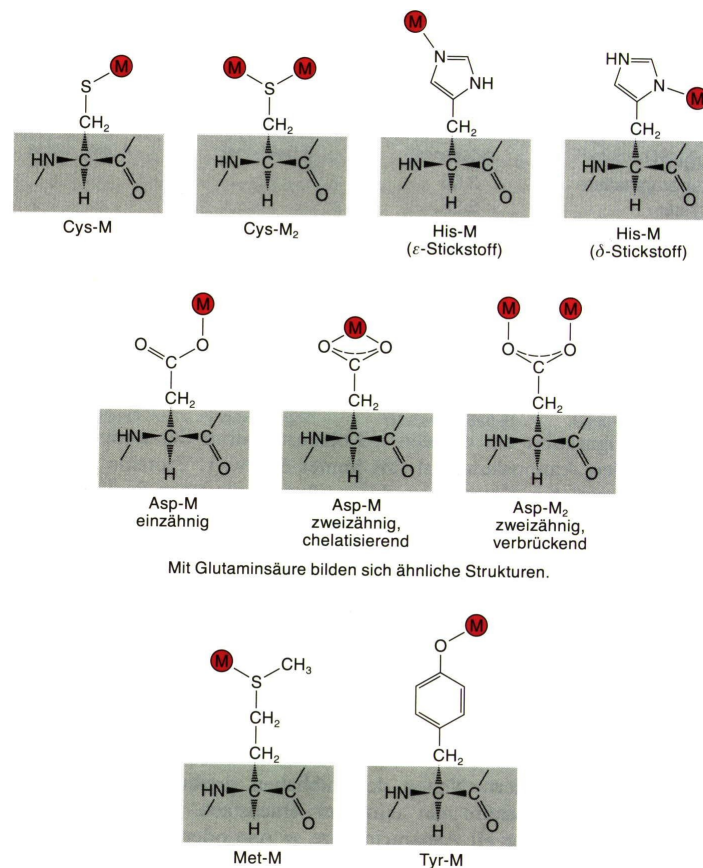


Abbildung 2.9 Bindungsmöglichkeiten von Metallionen an Aminosäuren [45]

In der Regel fungiert der organische Anteil der Metallproteine als Chelatligand. Chelatliganden (von lat.: chelae = Krepsscheren)^[46] sind Liganden, welche zwei oder mehr Koordinationsstellen am Zentralatom besetzen können. Für die kinetische Stabilität der Metallproteine ist die Geometrie des Chelatliganden von entscheidender Bedeutung. Die Tertiärstruktur entscheidet über die räumliche Anordnung der Liganden zueinander, die Größe der Tasche in welche das Metallion eingebettet ist, die katalytische Reaktivität des Metallzentrums und die Abschirmung des Metallzentrums gegenüber der umgebenden Matrix. Neben der direkten Bindung von Metallionen an Aminosäuren, werden Metalle in der Natur häufig über Kofaktoren an die Proteine gebunden. Ein Beispiel hierfür ist der Porphyrinring des Hämoglobins (Abbildung 2.10) oder des Koenzyms B¹² [45]. Neben diesen cyclischen Chelatliganden sind aber auch offene Formen bekannt.

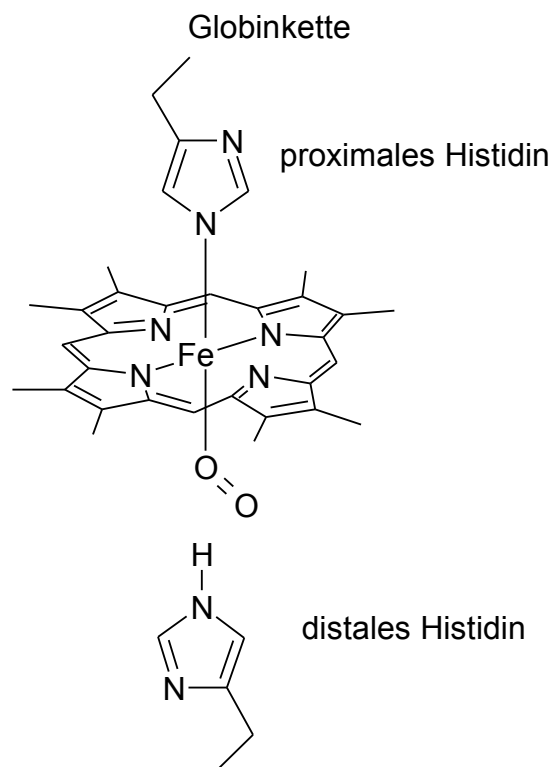


Abbildung 2.10 Metallzentrum des Hämoglobins

Aufgrund der starren Anordnung der Koordinationsstellen um das Zentralatom (Abbildung 2.10) und die gute Abschirmung des Metallzentrums sind diese Metallproteine sehr stabil. Hämoglobin kann aufgrund seiner Stabilität sogar mit einer ESI-MS untersucht werden, ohne dass der Eisenkomplex durch die Ionisation zerstört wird ^[20]. Des weiteren sind diese Systeme hoch selektiv. Metallproteine, welche ihr Metall über einen Porphyrinring binden, sind zum Beispiel nur mit den Elementen Eisen, Cobalt und Magnesium bekannt ^[47].

Aufgrund der verschiedenen biologischen Matrices, welche ebenfalls Einfluss auf die Proteinstruktur haben und der Vielfalt der Strukturen, welche selten vollständig bekannt sind, ist eine einfache Abschätzung der Stabilität schwer möglich.

2.12.1 HSAB-Prinzip

Das HSAB-Prinzip (HSAB, von engl. Hard and Soft Acids and Bases), welches 1963 von Pearson^[22] eingeführt wurde, ermöglicht eine empirische Abschätzung der Stabilität von Metallproteinen. Hierbei wird jedoch lediglich die nahe Umgebung des Metallzentrums betrachtet. Um das Prinzip anwenden zu können, betrachtet man die Komplexbildung als Säure-Base Reaktion. Das HSAB-Prinzip unterteilt die Metallionen beziehungsweise die Liganden in „harte“ und „weiche“ Säuren oder Basen. „Harte“ Säuren reagieren bevorzugt mit „harten“ Basen und „weiche“ Säuren bevorzugt mit „weichen“ Basen^[45]. Die „Härte“ entspricht einer hohen lokalisierten Ladungskonzentration und die „Weichheit“ entspricht einer leichten Verschiebbarkeit einer Elektronenwolke der Säure beziehungsweise Base. Dies kann nicht quantitativ erfasst, sondern nur in der qualitativen Reihung verschiedener Säuren und Basen untereinander angegeben werden. Harte Säuren sind demnach vor allem kleine und hochgeladene Kationen. Weiche Verbindungen besitzen eine hohe Elektronenaffinität, einen großen Ionenradius und hohe Polarisierbarkeit^[22]. Das HSAB-Prinzip ermöglicht Rückschlüsse auf die Eigenschaften von unbekannten Liganden bei bekanntem Metallzentrum. Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht biologisch relevanter Liganden und Metallionen und ihre Klassifizierung nach dem HSAB-Prinzip.

Tabelle 2.2 Übersicht HSAB [45]

Metalle				Liganden		
hart	H ⁺	Mn ²⁺	Cr ³⁺	H ₂ O	CO ₃ ²⁻	NH ₃
	Na ⁺	Al ³⁺	Co ³⁺	OH ⁻	NO ₃ ⁻	RNH ₂
	K ⁺	Ga ³⁺	Fe ³⁺	CH ₃ CO ₂ ⁻	ROH	RO ⁻
	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Tl ³⁺	PO ₄ ³⁻	R ₂ O	Cl ⁻
Grenze	Fe ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	NO ₂ ⁻	N ₃ ⁻	
	Co ²⁺	Cu ²⁺		SO ₃ ²⁻	Ph-NH ₂	
weich				Br ⁻		
	Cu ⁺	Pt ²⁺	Pt ⁴⁺	R ₂ S	R ₃ P	
	Au ⁺	Tl ⁺	Hg ²⁺	RS ⁻	CN ⁻	
	Cd ²⁺	Pb ²⁺		RSH	RNC	
				(RS) ₂ PO ₂ ⁻	CO	
				SCN ⁻	R ⁻	
				H ⁻		

2.12.2 18-Elektronenregel

Eine weitere Möglichkeit zur Abschätzung der Stabilität von Komplexverbindungen bietet die 18-Elektronenregel. Die 18-Elektronenregel basiert auf der Oktett-Theorie von Lewis, welche auf Koordinationsverbindungen ausgedehnt wurde, um die relativen Stabilitäten von Komplexen vorherzusagen ^[48]. Die Liganden werden wie Lewis-Basen betrachtet und können dem Metall-Ion, welches als Lewis-Säure angesehen werden kann, Elektronen – im allgemeinen ein Paar je Ligand – zur Verfügung stellen. Wenn die Elektronen des Metalls und die Bindungselektronen der Liganden in der Summe die Elektronenzahl des folgenden Edelgases also (n - 1) d¹⁰ ns² np⁶ (= 18 Elektronen) erreichen, ist die 18-Elektronen-Regel erfüllt. Komplexe, die die 18-Elektronen-Regel erfüllen, sind in der Regel stabile Verbindungen, da alle bindenden Orbitale besetzt und alle antibindenden unbesetzt sind. Bei oktaedrischen Komplexen ist

die Elektronenkonfiguration am stabilsten, bei der die bindenden a_{1g} -, t_{1u} -, e_g - und t_{2g} -Orbitale vollständig besetzt und alle antibindenden Orbitale leer sind. (Vgl. Abbildung 2.12 Seite 28) ^[49]

Komplexe mit einer großen Ligandenfeldaufspaltung im oktaedrischen Feld befolgen die 18-Elektronen-Regel, da die Besetzung der antibindenden e_g^* -Orbitale in diesem Fall ungünstig ist. Die Ligandenfeldaufspaltung ist besonders groß, wenn Liganden wie CO oder CN, welche π -Akzeptoren darstellen, die t_{2g} -Orbitale stabilisieren und somit die Bindung verstärken. In Komplexen mit schwachen Liganden und somit geringer Ligandenfeldaufspaltung können auch die nunmehr nur noch schwach antibindenden e_g^* -Orbitale mit Elektronen besetzt werden, was zu stabilen Komplexen mit einer Elektronenzahl zwischen 19-22 führt. Des Weiteren werden stabile Komplexe wie $[\text{WCl}_6]^{2-}$ (14 Elektronen), $[\text{TcF}_6]^{2-}$ (15 Elektronen) mit weniger als 18 Elektronen beobachtet. Dies ist der Fall, wenn das t_{2g} -Niveau nicht durch π -Bindungen zu den Liganden stabilisiert wird. Bei den frühen Übergangsmetallen, welche nur wenige Valenzelektronen besitzen, kann das Unterschreiten der 18-Elektronen-Regel auch sterische Gründe haben. In tetraedisch koordinierten Komplexen kann die 18-Elektronen-Regel nur erfüllt werden, wenn das Metall zehn oder mehr Valenzelektronen besitzt. Die 18-Elektronen-Regel kann nur angewendet werden, wenn die Art und Anzahl der Liganden bekannt ist.

Bei der Anwendung der 18-Elektronenregel sind folgende Regeln zu beachten:

- Die intramolekulare Elektronenverteilung ist so vorzunehmen, dass die Gesamtladung des Komplexes erhalten bleibt.
- Jede Metall-Metall-Bindung steuert ein Elektron zur Bilanz bei.
- Das Elektronenpaar eines Brückenliganden liefert je ein Elektron an die überbrückten Metallatome.

2.12.3 Ligandenfeldtheorie

Die Ligandenfeldtheorie betrachtet die Wechselwirkung der d-Orbitale des Zentralatoms mit den Komplexliganden. Diese vereinfachte Betrachtungsweise ermöglicht es charakteristische Eigenschaften eines Komplexes, wie das magnetische Verhalten, die Farbe, Absorptionsspektren, das bevorzugte Auftreten von Oxidationszahlen und Koordinationen sowie die Stabilität des Komplexes, durch das Verhalten der d-Elektronen des Zentralatoms im elektrostatischen Feld der Liganden zu erklären. Im Ligandenfeld wird die Entartung der fünf d-Orbitale aufgehoben, da die Liganden bei der Annäherung an das Zentralatom durch ihre Elektronenwolke eine elektrostatische Abstoßung verursachen. Die Wirkung des Ligandenfeldes ist aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Orientierung der d-Orbitale des Zentralatoms nicht für alle d-Orbitale gleich, was zu einer Aufspaltung der Energieniveaus führt.

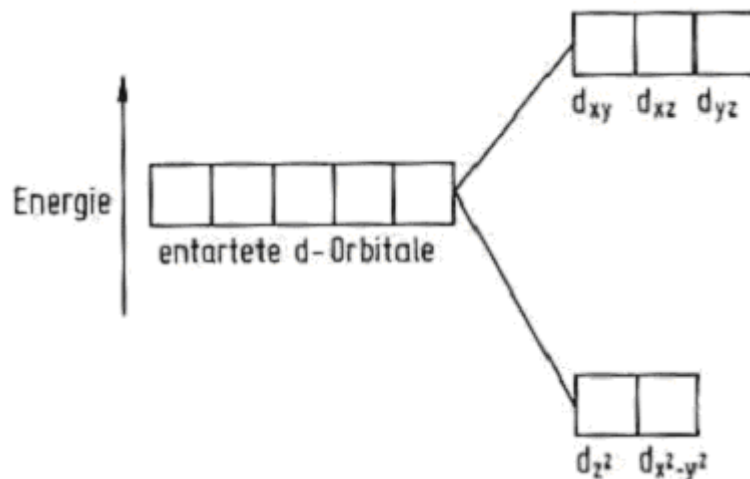


Abbildung 2.11 Ligandenfeldaufspaltung im tetraedrischen Ligandenfeld [49]

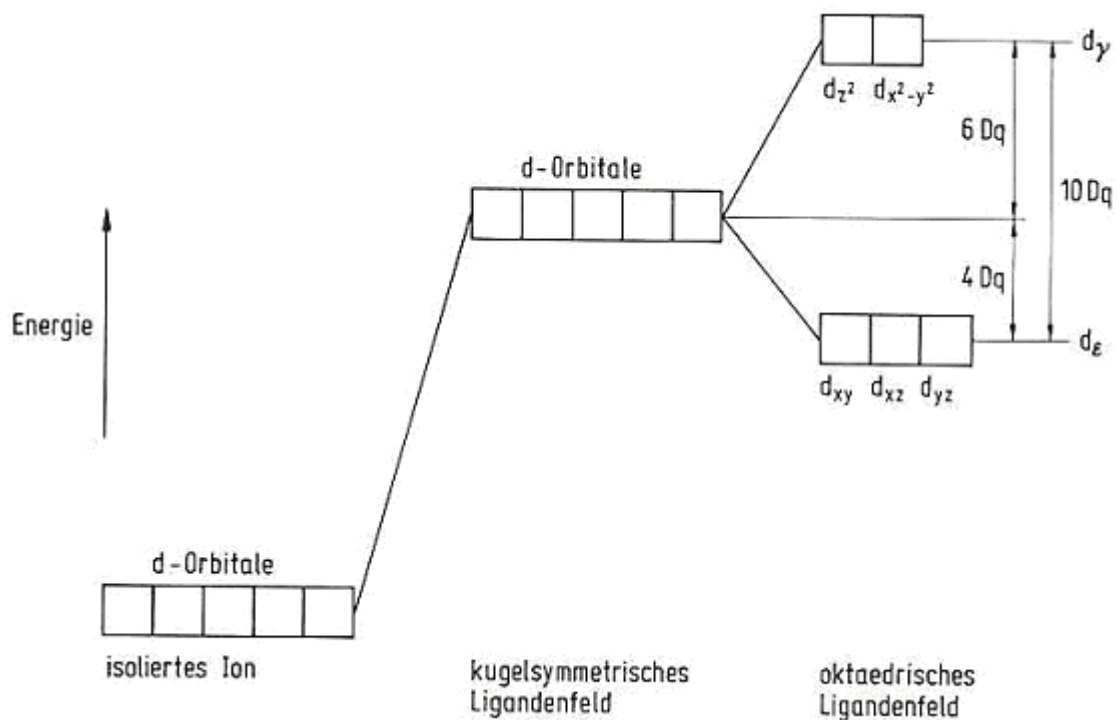
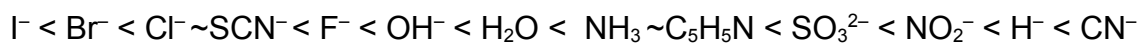


Abbildung 2.12 Ligandenfeldaufspaltung im oktaedrischen Ligandenfeld [49]

Die energetische Aufspaltung der d-Orbitale wird mit Δ bezeichnet. Die d-Orbitale werden zunächst gemäß der Hund'schen Regel mit Elektronen besetzt. Für Metalle mit der Elektronenkonfiguration d^1 bis d^3 und d^8 bis d^{10} gibt es jeweils nur eine Besetzungsmöglichkeit im oktaedrischen Ligandenfeld. Übergangsmetalle mit der Elektronenkonfiguration d^4 bis d^7 haben jedoch zwei Möglichkeiten ihre d-Orbitale zu besetzen. Sie können high-spin-Komplexe, also Komplexe mit möglichst großem Gesamtspin erzeugen, was oft eine Besetzung der energetisch ungünstigeren d_{z^2} - und $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale mit sich führt. Eine weitere Möglichkeit der Besetzung ist der low-spin-Komplex. Hierbei werden zuerst die energetisch günstigen d_{xy} , d_{xz} und d_{yz} Orbitale besetzt. Die resultierende Spinpaarung kostet jedoch Energie. Welche der beiden Konfigurationen gebildet wird, ist maßgeblich von der Ligandenfeldaufspaltung abhängig. Wenn die Ligandenfeldaufspaltung größer ist als die Spinpaarungsenergie, wird ein low-spin-Komplex gebildet, ist sie jedoch geringer wird ein high-spin-Komplex gebildet. Die Farbe eines Komplexes ist ebenfalls von der

Ligandenfeldaufspaltung abhängig. Bei Komplexen, in denen die d-Niveaus nicht vollständig besetzt sind, können Elektronen durch Energiezufuhr zum Beispiel durch Lichtabsorption angeregt werden und in ein energetisch höheres Orbital wechseln. Wenn diese Elektronen in ihr Ursprungsniveau zurückfallen, erzeugen sie die Farbe des Komplexes. Die Wellenlänge und somit die Energie, die zur Anregung benötigt wird, entspricht der Komplementärfarbe des Komplexes und der Ligandenfeldaufspaltung. Durch Variation von Zentralatom und Ligand konnte die spektrochemische Reihe aufgestellt werden ^[48], welche die Stärke der Feldaufspaltung durch einen Liganden widerspiegelt:



2.12.4 Humanblut

Das Blut des Menschen macht etwa 6–8% des Körpergewichtes aus, das entspricht einem Blutvolumen von 4–6 Litern ^[50]. Es durchströmt alle Organe und erfüllt wichtige Aufgaben beim Stofftransport und der Immunabwehr. Aus diesem Grund kann die Zusammensetzung des Blutes ein wichtiger diagnostischer Indikator für verschiedenste Erkrankungen sein. Blut besteht zum einen aus dem Blutplasma, einer Lösung von niedermolekularen Substanzen und Proteinen und zum anderen aus der Zellfraktion, welche sich aus Erythrocyten (44% Vol.) Leukocyten und Thrombocyten (zusammen 1% Vol.)^[50] zusammensetzt. Der pH-Wert schwankt in Abhängigkeit vom Kohlendioxidgehalt in einem Bereich zwischen 7,35 und 7,45. Im venösen Blut ist der pH-Wert etwas niedriger (pH = 7,37,^[50]) als im arteriellen Blut. Die Regulation des pH-Wertes erfolgt hierbei im wesentlichen über die Atmung und durch die Nierenfunktionen. Hierbei kommt ein Kohlensäure/Bicarbonat Puffersystem zum Einsatz. Das Blutplasma enthält bei einem gesunden erwachsenen Menschen 60–80 mg/ml Proteine, welche sich elektrophoretisch in fünf Hauptgruppen aufteilen lassen: die Albumine sowie die α_1 -, α_2 -, β - und δ -Globuline (Tabelle 2.3)^[50].

Tabelle 2.3 elektrophoretische Gruppen Blutplasma [50]

Gruppe	Protein	kDa	Relativ %
Albumin	Albumin	70	52-68
Alpha - 1	Thyroxine binding globulin	50	2,4-4,4
	Transcortin	55	
	Alpha-1-acid glycoprotein	44	
	Alpha-1-antitrypsin	54	
	Lipoprotein	19	
Alpha - 2	Haptoglobin	40	6,1-10,1
	Macroglobin	170	
	Ceruloplasmin	132	
Beta	Transferrin	80	8,5-14,5
	Hemopexin	35	
	Lipoprotein	20	
Gamma	IgG	150	10-21
	IgM	900	
	IgA	160	
	IgD		
	IgE		

Diese Proteingruppen, welche zum Beispiel die Faktoren der Blutgerinnung und Antikörper enthalten, setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlichster Proteine zusammen. Hierbei variiert die Quantität und die Aufgabenbereiche der einzelnen Proteine im biologischen System sehr stark. Aufgrund der großen Konzentrationsunterschiede der einzelnen Proteine (Abbildung 2.13) bildet Blutplasma daher eine analytisch anspruchsvolle Probenmatrix.

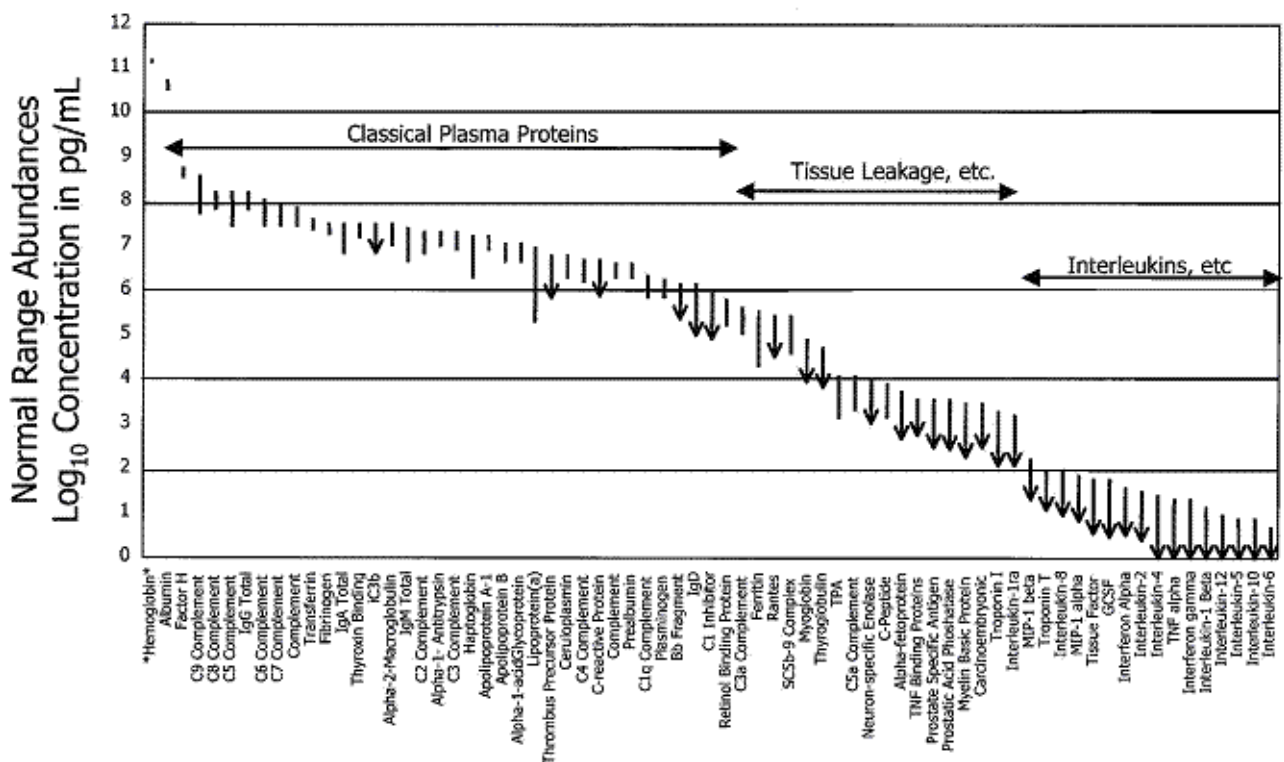


Abbildung 2.13 Proteinverteilung im Blutplasma [51]

Neben den Proteinen sind im Plasma Stoffe wie Lipide, Triglyceride, Cholesterin, Phospholipide und freie Fettsäuren, Glucose, Stoffwechselendprodukte wie Harnstoff, Harnsäure, Citrat und freie Aminosäuren sowie Elektrolyte gelöst [50]. Untersuchungen des Blutplasmas zeigten, dass zahlreiche Plasmaproteine wie z.B. das Ceruloplasmin, Metallproteine sind [52-57]. Die Proteine der zellulären Elemente des Blutes sind bislang kaum untersucht worden.

2.12.5 Analysetechniken von Metallproteinen in biologischen Matrices

Für die Proteinanalytik in biologischen Matrices ist die Separation der Proteine von entscheidender Bedeutung. Hierzu werden überwiegend chromatographische Trennmethode eingesetzt [18]. Die verbreitetste Trenntechnik ist die Gelelektrophorese, diese kann eindimensional (1-D) oder zweidimensional (2-D) eingesetzt werden. Die 2-D Gelelektrophorese besitzt im Vergleich zu flüssigkeitschromatographischen

Verfahren eine wesentlich höhere Trennleistung und kann sowohl denaturierend als auch nativ durchgeführt werden ^[18,54].

HPLC Methoden können hingegen auch präparativ verwendet werden, was die Kombination mit unempfindlicheren Analysesystemen wie zum Beispiel der NMR-Spektroskopie erlaubt. Des weiteren arbeitet die HPLC in der Regel ohne elektrisches Feld, welchem die Probe bei der Gelelektrophorese ausgesetzt ist. Daher ist die Separation bei fast allen HPLC-Trennverfahren unabhängig vom Salzgehalt der Probe. Zur Vermeidung von Artefakten ist es notwendig, dass der gesamte Laufmittelweg des verwendeten HPLC-Systems metallfrei ist, da ansonsten Metallkontaminationen, welche aus dem Leitungssystem der HPLC stammen, nicht ausgeschlossen werden können ^[50]. Des weiteren ist es unerlässlich, dass das eingesetzte Trennverfahren eine native Proteintrennung ermöglicht ^[54]. Separationsmethoden, wie zum Beispiel die in der Proteinanalytik ebenfalls weit verbreitete Reversed Phase Chromatographie (RP), welche mit organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol arbeiten, können zur Zerstörung von nicht kovalent gebundenen Metall-Protein-Spezies führen, oder deren Löslichkeit herabsetzen, was zum Ausfallen der Proteine führt. Neben leichten Anionenaustauschern oder der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (HIC), bietet die Size-Exclusion Chromatographie eine schonende Möglichkeit zur Metallproteintrennung, da es möglich ist, die Trennung unter nahezu nativen Bedingungen durchzuführen ^[18] und theoretisch keine chemischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Säulenmatrix auftreten ^[18]. Ein weiterer Vorteil der HPLC-SEC ist eine schnelle und genaue Bestimmung der Molmassen der Proteine. Für die Chromatographiesäule ist eine auf einer Polymermatrix basierenden SEC-Säule zu bevorzugen, da sie im Gegensatz zu silikatbasierenden Trennsäulen keine ionenaustauschenden Wechselwirkungen mit der Probe eingeht ^[18,19], was zur Zerstörung der Metall-Protein Komplexe führen kann. Einige Metall-Protein Komplexe wie zum Beispiel Hämoglobin sind stabil genug, um mit der organischen Massenspektrometrie untersucht zu werden ^[20].

Die Ionenquellen, welche hierbei Verwendung finden, fragmentieren die Analyten und atomisieren sie nicht wie die ICP-MS, hierdurch wird die Analyse von Massenfragmenten möglich. Am Häufigsten werden für diese Form der Massenspektrometrie, die MALDI (vgl. Kapitel 2.11) und die Elektrospray Ionisation (ESI) eingesetzt. Im Gegensatz zur

MALDI erzeugt die ESI eine Vielzahl unterschiedlich geladener Ionen, was die Interpretation von ESI-MS Daten häufig erschwert aber gleichzeitig den Zugang zu Strukturinformationen, welche sich in den Ladungszuständen widerspiegeln, ermöglicht. Dies ist auf die Funktionsweise von ESI-Quellen zurückzuführen. Bei der Elektrospray Ionisation werden die Analyten, welche in gelöster Form vorliegen, mit Hilfe einer feinen Kapillare zerstäubt. Zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode wird hierbei eine Potentialdifferenz (2-6 kV) ^[44] aufgebaut, was zur Aufbringung von positiven oder negativen Ladungen (abhängig von der Polarität) auf die Oberfläche der Flüssigkeit führt. Durch die Oberflächenspannung wird am Kapillarende ein Taylor-Kegel erzeugt, aus welchem sich geladene Tröpfchen lösen. Diese Tröpfchen werden durch Verdunstung des Lösungsmittels im Stickstoffgegenstrom und durch Coulomb-Explosionen verkleinert bis der Analyt vollständig vom Lösungsmittel befreit ist und im Massenanalysator untersucht werden kann. Hierbei verbleiben in Abhängigkeit von der Analytstruktur (Tertiär- und Quatärstruktur) unterschiedlich viele Ladungen auf dem Analyten. Werden analytisch reine Substanzen untersucht, können Rückschlüsse auf die Stöchiometrie der Metallzentren gezogen und das Protein identifiziert werden. Die Fragmentierung verhindert sowohl bei der ESI als auch bei der MALDI eine direkte Detektion der Metalle, da die Unterscheidung zwischen Molekülion und Metall nicht möglich ist. Des weiteren wurde von Veränderungen der Metallverteilung an den Proteinen durch ESI-Quelle berichtet ^[20]. Aufgrund der Komplexität von ESI-Spektren wurde in dieser Arbeit die MALDI-Technik zur Proteinidentifikation eingesetzt. Die ICP-MS, welche für die anorganische Analytik verwendet wurde, bietet im Vergleich zu anderen Detektionsverfahren wie zum Beispiel der ICP-OES ^[58] deutliche Vorteile im Bezug auf ihre Nachweisgrenze, welche bis in den Bereich von wenigen pg/l hinab reicht. Obwohl die ICP-MS ein hervorragender Multielementdetektor ist, wurden in den meisten Studien nur wenige Elemente untersucht ^[47,58], was durch das Auftreten von isobaren Interferenzen begründet sein kann. Durch den Einsatz einer Kollisions-/Reaktionszelle können diese Molekülinterferenzen ^[34] weitgehend reduziert werden, so dass das gesamte Potential der ICP-MS nutzbar ist.

3 Methoden

3.1 Chemikalien & Gase

Alle wässrigen Lösungen wurden unter Verwendung von ultra reinem Wasser ($18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), welches mit einer Wasseraufbereitungsanlage von Elga (Elga Purelab Ultra, Elga, Ransbach-Baumbach, Deutschland) erzeugt wurde, angesetzt. Tabelle 3.1 Zeigt eine Übersicht über alle Chemikalien, welche für die Darstellung der Laufmittel der HPLC eingesetzt wurden.

Tabelle 3.1 Chemikalien Laufmittel

Hersteller	Chemikalie/Standard
Fisher Scientific	HCl 37% p.a
Fluka,Buchs, Schweiz	Ammoniumacetat p.a
Fluka,Buchs, Schweiz	Zitronensäure 99 %+
Merck, Darmstadt, Deutschland	Tri-Natriumcitrat 99 %+
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Tris Ultra Qualität > 99,9 %

Für die Kalibration der ICP-MS wurden verschiedene Standardlösungen verwendet, welche von den Herstellerfirmen (Kraft, Duisburg & Merck, Darmstadt) mit einer Genauigkeit von $\pm 1\%$ zertifiziert wurden und eine Elementkonzentration von 1 mg/ml enthielten. Für den Betrieb des induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometers wurden neben Argon (Reinheit 4.6) insbesondere Helium, Wasserstoff und Sauerstoff (Reinheit 5.0) der Firma Air liquide (Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt. Des weiteren wurden für die Validierungsexperimente sowohl ein zertifizierter Grundwasserstandard (BCR, Geel, Belgien) als auch ein ebenfalls zertifizierter Blutstandard (Seronorm Typ II, Sero, Billingstand, Norwegen) als Referenzmaterialien verwendet.

Weiterhin wurden Proteinstandards und Chemikalien für die Kalibration der SEC, für die Gelelektrophorese und die Proteinquantifizierung nach Bradford eingesetzt. Eine Liste dieser Substanzen zeigt Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2 Sonstige Chemikalien

Hersteller	Chemikalie/Standard
Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland	HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis
Bio Rad, München, Deutschland	Commassie Blue (Bradford)
Fermentas, St. Leon-Rot , Deutschland	Page Ruler Prestained Protein Ladder
Fluka,Buchs, Schweiz	Alkalische Phosphatase (AP)
Merck, Darmstadt, Deutschland	DMF
Roth, Karlsruhe, Deutschland	BCIP
Roth, Karlsruhe, Deutschland	NBT
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	HSA
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	BSA (70 kDa)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Ferritin (440 kDa)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysozym (14 kDa)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Cytochrom C (12 kDa)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Natriumdodecylsulfat
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)

Alle Chemikalien (ohne Angabe der Herkunft) wurden von Fluka (Buchs, St. Gallen, Schweiz), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Soweit nicht anders angegeben weisen sie p.a. Qualität auf.

3.2 Instrumentelle Analytik

3.2.1 HPLC-System

Für die eindimensionalen Messungen wurde ein metallfreies Bio HPLC-System von Dionex bestehend aus einem Autosampler, einer Gradientenpumpe, einem UV/Vis-Diodenarray-Detektor (200 nm - 600 nm) und einem Fraktionssammler verwendet. Die Erweiterung dieses Systems zu einer zweidimensionalen HPLC, der Versuchsaufbau und die Funktionsweise werden im Kapitel 4.3 beschrieben. Alle eingesetzten

Komponenten sowohl für die ein- als auch für die zweidimensionale Anlage sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Instrumentelle Ausstattung HPLC-System

Gerät	Hersteller/Ort
Famos WP Autosampler	Dionex, Germering, Deutschland
Bio LC GS-50	Dionex, Germering, Deutschland
ICS-3000 SP	Dionex, Germering, Deutschland
UVD-170 U	Dionex, Germering, Deutschland
UVD-340 U	Dionex, Germering, Deutschland
Regio- CPF Digital Piston-pump	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Regio-Analog MS-4/6-100 Peristaltic-pump	Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
3x 10 Port MSV, PEEK, Valve	Rheodyne, Alsbach, Deutschland
Alltech Select Pro Column selector PEEK	Alltech, Worms, Deutschland
Valco 6 Port Valve PEEK	Dionex, Germering, Deutschland
Liquid Handler 221 XL	Gilson, Middleton, USA

3.2.2 ICP-MS

Die Elementdetektion wurde mit zwei induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometern durchgeführt. Hierbei wurden für die eindimensionalen HPLC-Analysen und für die Analyse des Eluenten der zweiten Dimension bei mehrdimensionalen Trennungen eine ICP-MS mit Kollisionszellentechnologie (7500 ce, Agilent Technologies, Yokogawa, Japan) eingesetzt um isobare molekulare Interferenzen, welche aufgrund der verwendeten Lösungsmittel und der anspruchsvollen Probenmatrix vermehrt auftreten zu reduzieren. Dieses Massenspektrometer wurde ebenfalls für die Gesamtmetallanalytik verwendet. Aufgrund der vorhandenen instrumentellen Ausstattung erfolgte die Metalldetektion nach der ersten Dimension während den mehrdimensionalen Separationen mit einem Massenspektrometer ohne Kollisionszelle (7500 a, Agilent Technologies, Yokogawa, Japan).

3.2.3 MALDI-TOF-MS

Die Proteinidentifizierung erfolgte mit Hilfe der organischen Massenspektrometrie. Hierzu wurde ein Time of Flight (TOF) Gerät der Firma Hewlett Packard (HP-G2030a), welches mit einer MALDI-Quelle ausgestattet ist, verwendet.

3.2.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein System der Firma Bio Rad bestehend aus einer Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, Bio Rad München, Deutschland) und dazugehörigem Netzteil (Power Pac Basic, Power Supply, Bio Rad München, Deutschland) eingesetzt. Dieses Elektrophoresesystem verwendet Gele der Größe 73 mm x 83 mm x 1 mm (H x B x T), welche aus einem Trenn- und einem Sammelgelbereich bestehen.

3.2.4.1 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist ein gut etabliertes Trennverfahren in der Proteinanalytik. Diese denaturierende Separationsmethode wurde zur Probenvorbereitung für die MALDI-Analytik (Kapitel 3.3.2 & 4.5.5) nach vorheriger multidimensionaler chromatographischer Trennung eingesetzt. Hierzu wurde ein Trenngel (10%), bestehend aus 3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 2,5 ml Tris/HCl (1,5 mol/l pH=8,8) sowie 4,0 ml Wasser verwendet. Dieses Trenngel wurde mit 0,01 % SDS versetzt und durch Zugabe von 0,1 ml Ammoniumpersulfat (APS 10 %) und 4 µl N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Polymerisation gebracht. Hierauf wurde ein Sammelgel, welches eine Fokussierung der Probe bewirkt, aufgebracht. Hierfür wurden 0,83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 3,4 ml Wasser und 0,63 ml Tris/HCl Puffer (pH= 6,8; 0,5 mol/l) mit jeweils 50 µl SDS (10 % Lösung) und APS (10% Lösung) sowie 5 µl TEMED versetzt. Das resultierende

Sammelgel besitzt einen Acrylamid/Bisacrylamid Anteil von 4%. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt, welcher zum einen eine pH-Anpassung der Probe gewährleistet und durch seine erhöhte Dichte zu einer vereinfachten Probenaufgabe führt. Ein Milliliter Probenpuffer besteht aus 0,53 ml Wasser, 0,13 ml Tris/HCl Puffer (pH=6,8; 0,5 mol/l), 0,22 ml SDS-Lösung (10%) sowie 0,11 ml Glycerol zur Erhöhung der Dichte und 50 µl Mercaptoethanol. Dem Probenpuffer wurden einige Kristalle Bromphenolblau hinzu gegeben um die Lauffront während der Elektrophorese beobachten zu können und somit den Austritt der Probe aus dem Gel zu vermeiden. Für die Trennung wurde die Elektrophoresekammer mit Elektrodenpuffer (0,025 M Tris/HCl, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS) gefüllt und für 5 Minuten mit 100 V betrieben. Anschließend wurde die Separation bei einer Spannung von 150 V innerhalb von 60 Minuten vollendet ^[60].

3.2.4.2 CN-PAGE

Die Colorless Native (CN) PAGE ist eine native Form der Gelelektrophorese. Sie wurde im Rahmen der HPLC-Gelelektrophoresekopplung (Kapitel 4.9) als dritte Trenndimension eingesetzt. Die hierfür verwendeten Gele hatten eine Zusammensetzung, welche bis auf das fehlende Natriumdodecylsulfat und Mercaptoethanol, deren Volumina durch Wasser ersetzt wurden, analog zur SDS-Page war. Die Zusammensetzung des Probenpuffers für diese Versuche ist gesondert in Kapitel 4.9.2 erläutert. Für die Separation wurde ein Elektrodenpuffer (0,025 M Tris/HCl , 0,192 M Glycin) ohne SDS eingesetzt und eine Spannung von 100 V für 5 Minuten und 150 V für 90 Minuten angelegt ^[61].

3.3 *Probenvorbereitung*

3.3.1 HPLC

Die untersuchten citratstabilisierten Blutproben wurden verschiedenen gesunden männlichen Probanden entnommen. Die Probenaufbereitung erfolgte direkt nach der Probenentnahme. Zuerst wurde das Blutplasma von den Blutzellen durch Zentrifugation (1500 g, 10 min) getrennt. Die Blutzellen wurden anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Danach konnten die Zellmembranen durch erneute Zentrifugation (21000 g, 10 min) entfernt werden. Anschließend wurde sowohl das Blutplasma als auch die membranfreie Zellfraktion in Aliquote zu je 1 ml aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Vorbereitende Experimente zeigten, dass die Proteinverteilung und die Metallverteilung an den Proteinen durch diese Lagerung nicht beeinflusst werden. Die membranfreie Zellfraktion wurde ausschließlich für die Untersuchungen zur Detektoroptimierung verwendet. Bei diesen eindimensionalen HPLC-Trennungen ist es möglich, dass mit niedrigen Injektionsvolumina (25 µl) und hohen Verdünnungen der Probe gearbeitet wird (siehe Kapitel 4.1). Im Gegensatz hierzu erfordert die zweidimensionalen HPLC-Separation und die nachfolgend angestrebte MALDI-Analytik höhere Aufgabemengen, welche bei der Untersuchung der membranfreien Zellfraktion zu Problemen bei der Datengewinnung führt. Dies ist zum einen auf die intensive Färbung, welche durch das Hämoglobin hervorgerufen wird, zurückzuführen. Hierdurch wird die UV/Vis-Detektion stark beeinträchtigt, da das Detektorlimit überschritten wird. Der hierdurch ebenfalls deutlich erhöhte Eintrag von Eisen in die ICP-MS führt zu starken Verunreinigungen des Massenspektrometers und somit zu kürzeren Wartungsintervallen, daher wurden alle nachfolgenden Versuche unter Verwendung von Blutplasma durchgeführt.

3.3.2 Proteinidentifizierung

Um den organischen Teil der detektierten Metall-Protein Assoziation zu analysieren wurde die MALDI-Technik angewendet^[36]. Hierzu wurden die Proteinfractionen, welche nach der zweiten Trenndimension der HPLC gesammelt wurden, mit Hilfe der SDS-PAGE (Kapitel 3.2.4.1) Aufgereinigt und entsalzt. Um die Position der Analyten im Gel bestimmen zu können, wurden die Proteinbanden mit der Coomassie-Färbung detektiert. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Fixierung und Färbung der Proteine. Dies geschah simultan durch die Inkubation über Nacht mit einer wässrigen Lösung, bestehend aus 50 % Methanol und 10 % Essigsäure sowie 0,1 % Coomassie R-250. Durch einen abschließenden Waschprozess mit Wasser konnte die Färbung des Hintergrundes reduziert werden, wodurch die Proteinbanden deutlich sichtbar werden. Im Gegensatz zu einem Waschprozess mit Methanol/Essigsäure oder Methanol/Wasser hebt der Einsatz von Wasser als Waschmittel das Schrumpfen der Gele, welches durch die Verwendung von Methanol während der Färbung verursacht wird, auf. Hierdurch kann die Geometrie des Gels erhalten werden, was die weitere Aufarbeitung erleichtert. Die Gelbereiche mit den Proteinbanden konnten nun mit einem Skalpell aus dem Gel gelöst, und separat in Eppendorf-Gefäße überführt werden. Anschließend wurden die Gelstücke für 15 Minuten mit 100 µl Wasser und 30 Minuten mit 100 µl Acetonitril/Wasser (3:2) gewaschen, um anschließend eine Desolvatation mit Hilfe der SpeedVac durchzuführen. Zur Vermeidung von Störungen der massenspektrometrischen Analysen durch den Farbstoff Coomassie R-250, welcher für die Färbung der Proteine eingesetzt wurde, wurde dieser durch die Inkubation mit einer Ammoniumhydrogencarbonat Lösung (75 µl, 50 mmol/l NH_4HCO_3) für 15 Minuten und dem Auswaschen des Farbstoffes mit Acetonitril/Wasser (3:2) entfernt. Hiernach konnten die Proteine durch mehrfache Inkubation mit Acetonitril/Wasser (3:2) für 60 Minuten aus dem Gel extrahiert werden. Anschließend wurde das Lösungsmittel in der SpeedVac entfernt. Der Rückstand wurde mit THF/Sinapinsäure aufgenommen und nach dem Aufbringen auf einen MALDI Probenträger im Massenspektrometer analysiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. S. Wunderlich (Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen).

3.4 HPLC

3.4.1 Size-Exclusion-Chromatographie

Die SEC-Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer polymerbasierten Tricorn Superdex 200 10/300 GL SEC-Säule (Amersham Biosciences, Otelfingen, Schweiz). Diese Säule ermöglicht die Trennung von Proteinen, deren Molekulargewicht in einem Bereich von 10 kDa bis 600 kDa liegt ^[53]. Alle Messungen wurden unter Verwendung eines Citratpuffers (pH 7,4; 40 mM) ^[54] als Eluent und einem konstanten Fluss von 0,30 ml/min durchgeführt. Die Gesamtdauer einer Messung betrug 100 Minuten. Im eindimensionalen Betrieb wurden 25 µl der Probe, welche im Verhältnis 1:1 mit dem Laufmittel verdünnt wurde, injiziert. Für die mehrdimensionalen Analysen wurde die Probenaufgabemenge auf 150 µl (2:1 Probe:Puffer) erhöht, um eine für die nachfolgende Proteinidentifizierung ausreichende Proteinmenge nach der zweiten Trenndimension erhalten zu können.

3.4.2 Präparation der Säulen

Ein Teil der verwendeten Chromatographiesäulen, welche für die zweite Trenndimension und das Trap-System verwendet wurden, sind aufgrund der benötigten Säulendimensionen und der erforderlichen Metallfreiheit nicht kommerziell erhältlich. Diese Trennsäulen mussten daher angefertigt werden.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Techniken für die Füllung von HPLC-Trennsäulen. Zum einen besteht die Möglichkeit die Säulen trocken zu Befüllen und das Material durch Vibrationen zu verdichten ^[21]. Diese Methode eignet sich allerdings nur für Materialien mit einer Partikelgröße > 20 µm ^[21,55], da sich kleinere Partikel zusammenlagern würden und sich somit ein inhomogenes Säulenbett ausbildet. Für die Präparation der eingesetzten Chromatographiesäulen wurde daher eine Variante der Nassfüllung, bei welcher das Material vor der Füllung in einer Flüssigkeit aufgeschlämmt wird ^[21],

angewendet. Hierzu wurden metallfreie Leersäulen (Alltech, Worms, Deutschland) mit unterschiedlichen Längen (siehe Kapitel 3.4.3 - 3.4.5) und einem Durchmesser von 2,1 mm verwendet. Zum Befüllen der Säulen wird das untere Ende mit den dafür vorgesehenen Verschraubungen an eine 16' Kapillare und einer Pumpe angeschlossen. Aufgrund des geringen Gegendrucks, der durch die hier verwendeten kleindimensionalen HPLC Säulen erzeugt wird, kann anstelle der häufig eingesetzten Wasserstrahl- oder Membranpumpen eine Taumelkolbenpumpe verwendet werden. Der Einsatz der Taumelkolbenpumpe ermöglicht eine bessere Kontrolle der Flußbedingungen während der Befüllung, was die Gefahr des Trockenlaufens der Säule verringert. Das offene Ende der Leersäule kann nun mit einem Trichter (Abbildung 3.1) versehen werden.

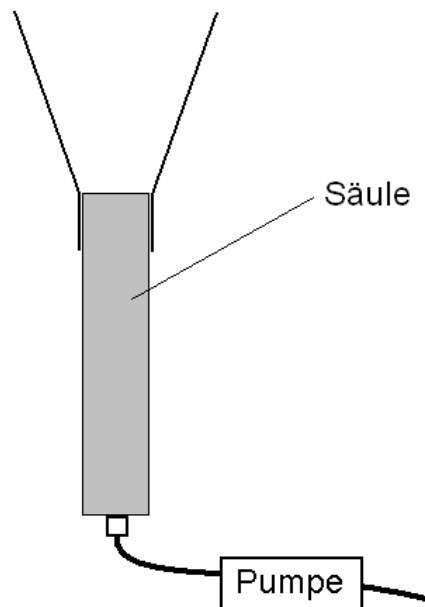


Abbildung 3.1 Aufbau zur Säulen-Präparation

Hierüber wird die Säule zunächst mit Puffer gefüllt. Anschließend wird unter kontinuierlichem Fluß die erforderliche vorgequollene Partikelsuspension hinzu gegeben. Nachdem die Partikel sedimentiert sind, wird der Fluß für weitere 60 Minuten aufrecht erhalten, um eine Verdichtung der Partikel in der Säule zu ermöglichen. Anschließend kann die Chromatographiesäule verschlossen und in das HPLC-System integriert werden. Vor dem ersten Gebrauch wird die Säule über Nacht mit dem vorgesehenen Eluenten equilibriert.

3.4.3 Anionenaustauscherchromatographie

Für die Anionenaustauscherchromatographie wurde eine analytische Trennsäule mit der in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Technik angefertigt. Hierzu wurde eine metallfreie Leersäule (2,1 mm x 50 mm) der Firma Altech (Worms, Deutschland) mit einem starken Anionenaustauscher (Hamilton PRP-X100) bestückt. Für die Säulenpräparation wurde ein Tris/HCl Puffersystem (50 mmol/l; pH = 7,4 + 0,5 mol/l NH₄Ac) verwendet.

Nach der Optimierung der Trennung (Kapitel 4.4.2) wurde die Chromatographie mit einem Tris/HCl Puffersystem (Puffer A: Tris/HCl pH 7,4 40 mM; Puffer B: Puffer A + 0,6 mol/l NH₄Ac) und einem Fluß von 0,3 ml/min durchgeführt. Der Verlauf des eingesetzten Stufengradienten ist in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4 Anionenaustauscherchromatographie Gradient

Zeit [min]	Puffer B [%]
0 - 3	0
3 - 5	10
5 - 8	20
8 - 10	100

3.4.4 Mischbettionenaustauscher (IEX)

Der Mischbettionenaustauscher, welcher sowohl im Trap-System der zweidimensionalen HPLC als auch in der zweiten Trenndimension zum Einsatz kommt wurde aufgrund der benötigten Säulendimensionen und der erforderlichen Metallfreiheit der Säulen präpariert. Hierzu wurde die Füllmethode angewendet, welche in Kapitel 3.4.2 beschrieben wurde. Als Säulenmaterial wurden sowohl Anionen- als auch Kationenaustauschermaterial eingesetzt (Fractogel AEX & Fractogel CEX, Merck, Darmstadt). Aufgrund der gegensätzlich geladenen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Materialien,

welche bei der direkten Vermischung zu Aggregatbildung führen würden, ist es unerlässlich dies durch eine geeignete Vorbereitung der Partikelsuspension zu vermeiden.

Hierzu wird sowohl eine Suspension mit AEX-Partikeln als auch mit CEX-Partikeln separat angesetzt. Für beide Suspensionen wurde ein Tris/HCl Puffer (pH=7,4; 40mmol/l) verwendet, welchem 1,5 mol/l Natriumchlorid hinzugefügt wurde. Nachdem dies geschehen ist, können beide Aufschlämmungen miteinander vereinigt werden. Durch die hohe Kochsalzkonzentration in den Puffern werden die funktionellen Gruppen auf beiden Materialien mit entsprechenden Gegenionen abgesättigt, was die Aggregatbildung verhindert. Da eine gezielte Optimierung des Mischungsverhältnisses von AEX und CEX für die Separation von Humanblutplasma aufgrund der hohen Analytdichte und der komplexen Probenmatrix nur für die Separation einzelner Komponenten, deren Auswahl aufgrund der jeweiligen Problemstellung erfolgen muß, durchgeführt werden kann (vgl. Kapitel 2.6), wurde für die Entwicklung einer Übersichtsmethode, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit angestrebt wird, ein Mischungsverhältnis von 1:1 gewählt. Das Austauschergemisch kann nun wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, in die Leersäulen (2,1mm x 30 mm) für das Trap-System und der analytischen Trennsäule (2,1mm x 50 mm) gefüllt werden. Als Laufmittel wurde ein Tris/HCl Puffersystem (Puffer A: Tris/HCl pH = 7,4 40 mM; Puffer B: Puffer A + 0,6 mol/l NH₄Ac) verwendet. Der Gradient, welcher nach der Optimierung der Trennung (Kapitel 4.4.4) ermittelt wurde, ist in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Separation erfolgte bei einem konstanten Fluß von 0,3 ml/min.

Tabelle 3.5 Mischbettionenaustauscher (IEX) Gradient

Zeit [min]	Puffer B [%]
0 - 1,5	39
1,5 - 3	43
3- 10	100

3.4.5 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie wurde ebenfalls mit einer nicht kommerziell erhältlichen Trennsäule durchgeführt. Hierzu wurde eine Leersäule der Firma Altech (2,1mm x 50 mm) mit HIC-Material (Resorce Phenyl, Amersham Biosciences, Otelfingen, Schweiz) gefüllt. Als Puffer für die Säulenpräparation wurde ein Tris/HCl Puffer (50 mmol/l; pH= 7,4; 0,6 mol/l NH₄Ac) verwendet. Nach der Optimierung der Trennung (Kapitel 4.4.3) wurde folgender Gradient mit einer Flußrate von 0,3 ml/min für die HIC-Separation eingesetzt:

Tabelle 3.6 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie Gradient

Zeit [min]	Puffer B [%]
0 - 0,75	100
0,75 - 2,25	30
2,25 - 3,25	10
3,25 - 10	0

3.5 Mikrowellendruckaufschluß

Für die Bilanzierung der HPLC wurden neben zertifizierten Referenzmaterialien Realproben analysiert. Für die Interpretation der Quantifizierungsdaten aus den HPLC-Analysen ist der Vergleich mit Daten aus der Gesamtmetallbestimmung erforderlich. Zur Probenvorbereitung für die Gesamtmetallbestimmung wurde das Blutplasma einem Mikrowellendruckaufschlusses unterzogen. Hierfür wurde eine Mikrowelle der Firma CEM GmbH (Mars 5, CEM GmbH Kamp-Lintfort, Deutschland) verwendet. Zuerst wurde 1 ml Probe mit 3 ml Salpetersäure und 2 ml Wasserstoffperoxid versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 600 W in der Mikrowelle innerhalb von 10 Minuten auf 80 °C erhitzt. Diese Temperatur wurde für weitere 10 Minuten konstant gehalten. Danach wurde die Temperatur schrittweise innerhalb von 4 Minuten auf 130 °C

und nach weiteren 2 Minuten auf 180 °C erhöht. Nachdem diese Temperatur für 10 Minuten konstant gehalten wurde, war das Aufschlussprogramm beendet. Die aufgeschlossenen Proben wurden im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt und in der ICP-MS analysiert.

3.6 Proteinquantifizierungen (nach Bradford, 1976)

Sowohl in der Routineanalytik von Metall-Protein Assoziationen als auch für die Charakterisierung des HPLC-Systems ist die Proteinquantifizierung von entscheidender Bedeutung. Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde die Methode von Bradford ^[44,59] eingesetzt. Bei dieser relativ empfindlichen Methode (0,2 µg Protein)^[60] wird die Probe mit einer sauren Coomassie G-250 Lösung versetzt. Hierbei verändert sich die Absorption durch die Bindung des Coomassie an die Proteine von $\lambda=465$ zu $\lambda=595$ nm. Für die Kalibration des Photometers (Bio Photometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) wurde Rinderserum Albumin (BSA) verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte, bezogen auf eine BSA-Standard Reihe, mittels der vom Hersteller mitgelieferten Software. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf das Volumen der Probe normiert.

3.7 Test der enzymatischen Aktivität

Die Überprüfung der Nativität der Proteintrennung wurde exemplarisch am Beispiel der Alkalischen Phosphatase (AP) durchgeführt. Die Alkalische Phosphatase ist ein Metallprotein, welches die Elemente Magnesium und Zink enthält ^[45]. Hierbei ist das Zink direkt an der katalytischen Reaktion der Alkalischen Phosphatase beteiligt, wohingegen das Vorhandensein des Magnesiums direkten Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins besitzt, daher hat der Verlust eines oder beider Metalle auch den Verlust der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase zur Folge.

Der Test der enzymatischen Aktivität erfolgt hierbei in einem Polycrylamid-Gel nach vorangegangener elektrophoretischer Aufreinigung. Hierzu wird das Gel zunächst durch

Inkubation mit einem Tris/HCl-Puffer (100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl_2 , 100 mmol/l Tris-HCl, pH = 9,5) vorbereitet. Nach einigen Minuten kann der Puffer durch die Reaktionslösung bestehend aus 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) und Nitro-blue-tetrazolium-chloride (NBT) (5 ml: 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl_2 , 100 mmol/l Tris-HCl, pH = 9,5, 33 μl NBT, 33 μl BCIP) ersetzt werden. Die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das farblose BCIP, welches nun dimerisieren kann und einen blauen Farbstoff bildet. Aus dem NBT, welches hierbei protoniert wird, entsteht parallel hierzu das blaue Formazan^[60] (Abbildung 3.2). Die Blaufärbung der Proteinbande ist somit ein Indikator für das Vorhandensein der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

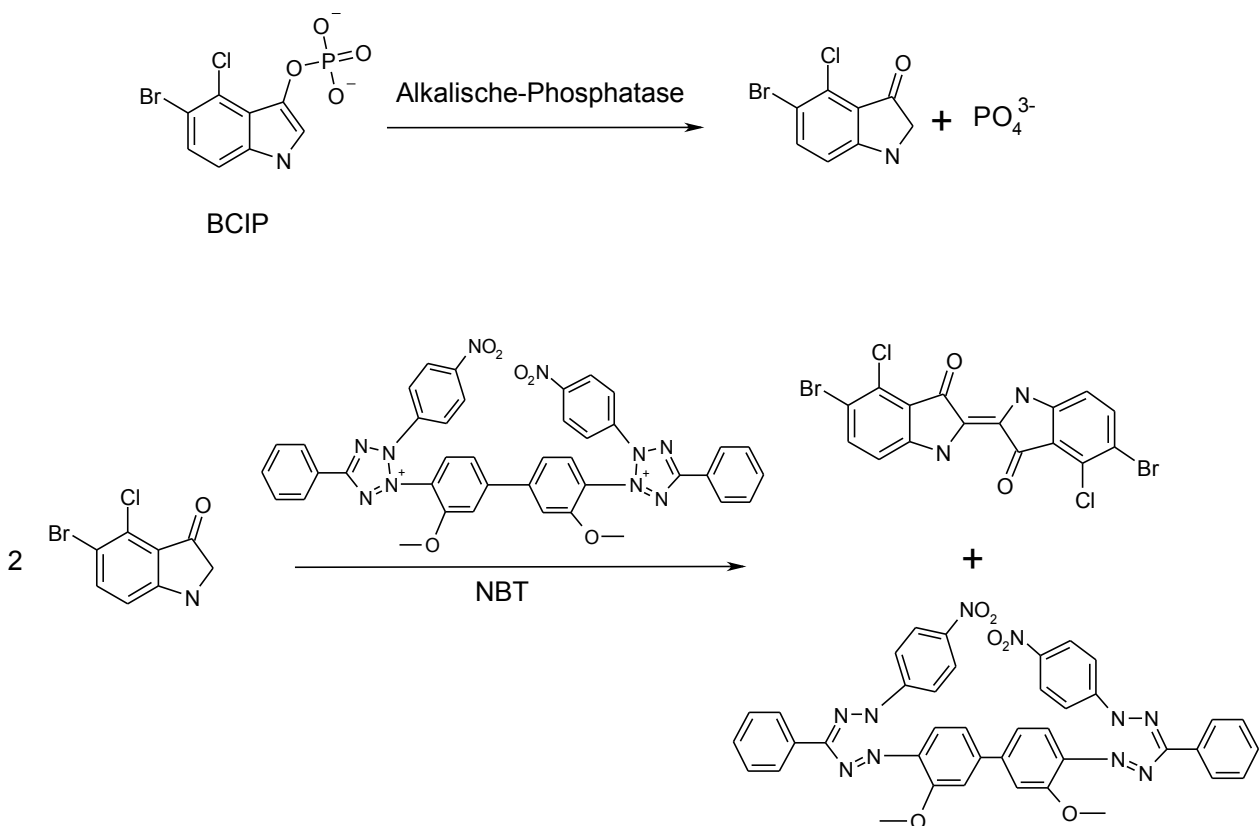


Abbildung 3.2 Mechanismus der AP-katalysierten Farbreaktion

Die Farbreaktion kann nun abschließend durch die Zugabe von PBS-Puffer, welcher mit 20 mM EDTA versetzt wurde beendet werden. Hierbei wird zum einen das Gleichgewicht, durch das im PBS-Puffer enthaltene Phosphat in Richtung der Edukte, verschoben und das Magnesium der Alkalischen Phosphatase in Form eines EDTA-Komplexes entzogen, was zum Verlust der Tertiärstruktur und der enzymatischen Aktivität führt.

4 Ergebnisse

4.1 Detektoroptimierung

Die induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie ermöglicht eine äußerst nachweisstarke Multielementdetektion. In komplexen biologischen Matrices wird jedoch der Nachweis vieler Elemente durch isobare molekulare Interferenzen limitiert. Eine Möglichkeit der Reduktion dieser Störungen bietet der Einsatz einer Kollisions-/Reaktionszelle, in welcher molekulare Interferenzen durch Kollision oder Reaktion mit einem Gas minimiert werden. Um die Möglichkeiten dieser Technologie optimal nutzen zu können, wurden vier verschiedene Gasmodi für die Analyse von Humanblut angewendet, was den anschließenden Vergleich der Signal/Rausch Verhältnisse ermöglicht. Hierzu wurde sowohl das Blutplasma als auch die membranfreie Zellfraktion, welche durch Zentrifugation (1500 g ;10 min) aus citratstabilisiertem Vollblut gewonnen wurde, 1:1 mit Citratpuffer (pH = 7,4; 40 mmol/l) verdünnt, mit der Size-Exclusion Chromatographie (Parameter siehe Kapitel 3.4.1) getrennt und mittels ICP-MS analysiert. Für den Vergleich der verschiedenen Gasmodi wurden die vom Gerätehersteller vorgesehenen Kollisions-/Reaktionsgase wie Helium und Wasserstoff, sowie der Normalmodus (ohne Kollisions-/Reaktionsgas) getestet. Aufgrund der Signifikanz von Heteroelementen wie Phosphor und Schwefel (Kapitel 2.9) für die Metallproteinanalytik wurde die Reaktionszelle ebenfalls mit Sauerstoff betrieben. Hierdurch wird ein sensitiver Nachweis von Phosphor und Schwefel als Oxid (^{47}PO , ^{48}SO , ^{50}SO) ermöglicht; die verwendeten ICP-MS Parameter sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1 Geräteeinstellungen CRC

	Normalmodus	Wasserstoffmodus	Heliummodus	Sauerstoffmodus
RF power	1490 W	1490 W	1490 W	1490 W
sample position	7,0 mm	7,0 mm	7,0 mm	7,0 mm
Carrier gas	0,8 l/min	0,8 l/min	0,8 l/min	0,8 l/min
Makeup gas	0,4 l/min	0,4 l/min	0,4 l/min	0,4 l/min
Wasserstoff (ORC)	-	3 ml/min	-	-
Helium (ORC)	-	-	3 ml/min	-
Sauerstoff (ORC)	-	-	-	0,7ml/min
QctP-Bias	-6 V	-18	-18	-15
OP-Bias	-3V	-16	-16	-15,8
Aquisizionszeit pro Masse	0,1 s	0,1 s	0,1 s	0,1 s

Alle nicht aufgeführten Geräteeinstellungen wurden im Helium-, Wasserstoff- und Normalmodus auf maximale Signalintensität und minimale Oxidbildungsraten optimiert. Im Sauerstoffmodus wurden hingegen maximale Oxidbildungsraten angestrebt.

Die Untersuchungen zeigten deutliche Verbesserungen des Signal/Rauschverhältnisses bei den Messungen im Kollisions-/Reaktionsmodus (Tabelle 4.2). Argon-Interferenzen ließen sich im Wasserstoffmodus am effektivsten reduzieren. Der Heliummodus hingegen ist universeller einsetzbar, da verschiedenste molekulare isobare Interferenzen effektiv verringert werden. Hierdurch wird sogar die Auswertung der Phosphor- und Schwefel-Signale nach chromatographischer Trennung von Humanblut ermöglicht (Abbildung 4.1 und 4.2). Die Detektion dieser Elemente kann ebenfalls im Sauerstoffmodus erfolgen. Der Vergleich des Phosphorsignals, welche zum einen im Heliummodus aufgenommen wurde und dem ^{47}PO -Signal, welches im Sauerstoffmodus analysiert wurde (Abbildung 4.2), zeigt eine leichte Reduktion des Hintergrundes, des Rauschens und der Signalintensität des ^{47}PO -Signals gegenüber dem Elementsignal vom Phosphor.

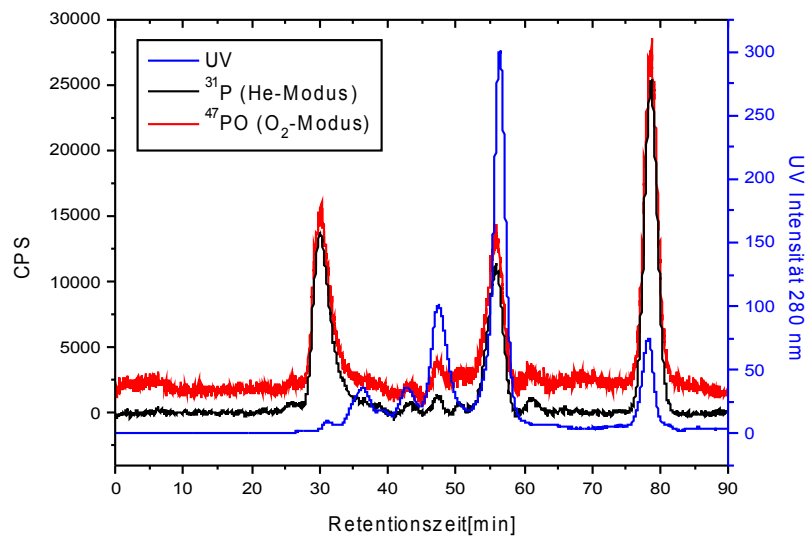
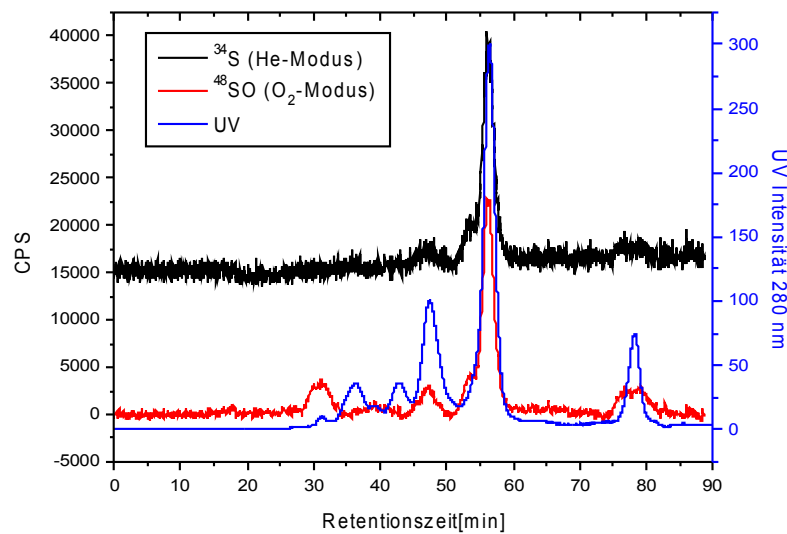


Abbildung 4.1 P(-), PO(-) und UV- Chromatogramm (-) von Blutplasma Fluß: 0.30 ml/min
Eluent: Citratpuffer pH 7.2 , 0.04 M , Trennsäule: Tricorn Superdex 200 10/300 GL

Der Einsatz des Sauerstoffmodus für die Analyse von Schwefel hingegen bietet im Vergleich zum Heliummodus deutlichere Vorteile. Neben einer Reduktion des Rauschens ist eine starke Verringerung des Hintergrundes (Abbildung 4.2) zu beobachten. Hierdurch wird es möglich, Schwefelsignale zu detektieren, welche im Heliummodus durch das hohe Hintergrundsignal überlagert werden (Abbildung 4.2 RT = 32 min und 39 min). Signale mit einer niedrigen Intensität im Heliummodus (RT= 46 min & 78 min) und einem Signal-/Rauschverhältnis < 3 , bei welchen ein artifizieller Ursprung aufgrund von Matrixeffekten nicht ausgeschlossen werden kann, konnten im Sauerstoffmodus eindeutig als Signal identifiziert werden.



**Abbildung 4.2 S(-), SO(-) und UV- Chromatogramm (-) von Blutplasma ;
chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1**

Die Vermeidung von Artefakten durch isobare Interferenzen ist ebenfalls in der Multielementanalytik von komplexen biologischen Proben von entscheidender Bedeutung. Ein Beispiel für diese Problematik stellt das Elementsignal von Germanium (Abbildung 4.3), welches bei der Analyse der membranfreien Zellfraktion im Normalmodus aufgenommen wurde, dar. Dieses Signal wurde durch eine Eisenoxidinterferenz hervorgerufen. Hierbei sind mehrere Isotope von der Interferenz betroffen ($^{56}\text{Fe}^{16}\text{O} = ^{72}\text{Ge}$; $^{57}\text{Fe}^{16}\text{O} = ^{73}\text{Ge}$). Mit Hilfe der Kollisions-/Reaktionszellentechnologie kann hierbei die Artefaktbildung unterdrückt werden, was die Gefahr von Fehlinterpretationen der Daten verringert.

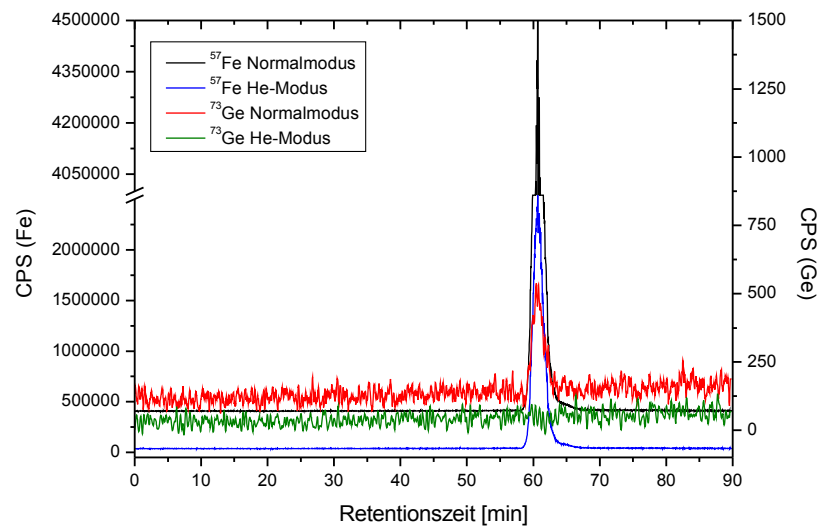


Abbildung 4.3 ICP-MS Signal der membranfreien Zellfraktion von Eisen(--) und Germanium (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1

In Tabelle 4.2 sind die Signal/Rauchverhältnisse der intensivsten Signale aller analysierten Isotope aus den Messungen von Blutplasma und der membranfreien Zellfraktion zusammengefasst. Des weiteren wurden die häufigsten isobaren molekularen Interferenzen der Isotope für den Vergleich der einzelnen Gasmodi hinzugezogen.

Tabelle 4.2 Vergleich der CRC-Gasmodi

Masse	Element	Normalmodus Signal/Rausch	Heliummodus Signal/Rausch	Wasserstoffmodus Signal/Rausch	Sauerstoffmodus Signal/Rausch	Isobare Interferenzen ^[62]
25	Mg	38	49	50	39	$^{12}\text{C}_2^+$
27	Al	12	25	8	9	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+, ^{13}\text{C}^{14}\text{N}^+, ^{14}\text{N}_2, ^1\text{H}^1$ $^{2}\text{C}^{14}\text{N}^+$
31	P	nn	20	11	^{47}PO : 22	$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+\text{H}^+, ^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+, ^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$ $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$
32	S	nn	28	nn	^{48}SO : 85	$^{16}\text{O}_2^+$
34	S	nn	30	4	^{50}SO : 89	$^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$
40	Ca	-	80	146	-	$^{40}\text{Ar}^+$
43	Ca	6	15	14	4	$^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^+$
54	Fe	326	925	1081	330	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+, ^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$
55	Mn	7	<3	9	8	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+\text{H}^+, ^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+, ^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
56	Fe	343	966	1104	197	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+, ^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
57	Fe	386	944	1092	253	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+\text{H}^+, ^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$
59	Co	<3	4	7	<3	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+, ^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+, ^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+, ^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+\text{H}^+$
60	Ni	120	185	132	112	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+, ^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}^+$
65	Cu	25	23	22	24	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+\text{H}^+, ^{40}\text{ArMg}^+, ^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^{21}\text{H}^+$
66	Zn	31	35	35	23	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+, ^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$
68	Zn	30	31	40	32	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+, ^{36}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$
73	Ge	9	nn	nn	28	$^{57}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$
118	Sn	8	5	5	5	$^{102}\text{Ru}^{16}\text{O}^+, ^{102}\text{Pd}^{16}\text{O}^+$
120	Sn	7	6	6	5	$^{104}\text{Ru}^{16}\text{O}^+, ^{104}\text{Pd}^{16}\text{O}^+$
121	Sb	6	<3	<3	nn	$^{105}\text{Pd}^{16}\text{O}^+$
123	Sb	6	<3	<3	nn	$^{94}\text{Zr}^{16}\text{O}_2^+$
208	Pb	10	10	8	8	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$
209	Bi	11	15	14	12	$^{193}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$

4.2 Nativität

Für die Analytik von Metallproteinen ist der Erhalt ihrer Tertiärstruktur während der gesamten Trennung von entscheidender Bedeutung, da die Bindung der Metalle an das Protein häufig über koordinative Wechselwirkungen erfolgt, deren Stabilität maßgeblich von der Geometrie der Liganden abhängt. Die Stabilisierung von Blutproben erfolgt hauptsächlich durch die Verwendung von drei verschiedene Substanzen. Neben Citrat, welches in geringen Konzentrationen ein natürlicher Bestandteil von Blut darstellt und Heparin, welches gezielt die Gerinnungsfaktoren im Blut hemmt^[50], wird auch der Komplexbildner EDTA eingesetzt. Daher wurde der Einfluss von geringen EDTA Konzentrationen auf die Metall- und Proteinverteilung in Humanplasma untersucht, um Erkenntnisse über die Verwendbarkeit von EDTA- stabilisierten Blutproben für die Analytik von Metallproteinen und nicht kovalent gebundenen Metallproteinassoziationen zu gewinnen. Hierzu wurde humanes Blutplasma mit Hilfe der HPLC-SEC-ICP-MS Kopplung analysiert. Die Untersuchungen wurden dreifach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Daten gewährleisten zu können. Hierbei wurde die EDTA Konzentration des Laufmittels durch die Verwendung von zwei Citratpuffern (pH 7,4; 40 mmol/l und pH 7,4; 40 mmol/l + 20 mmol/l EDTA), welche durch die Gradientenpumpe der HPLC Anlage dosiert wurde, variiert. Abbildung 4.4 zeigt die UV-Chromatogramme der SEC-Separation von Blutplasma bei unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen im Eluenten.

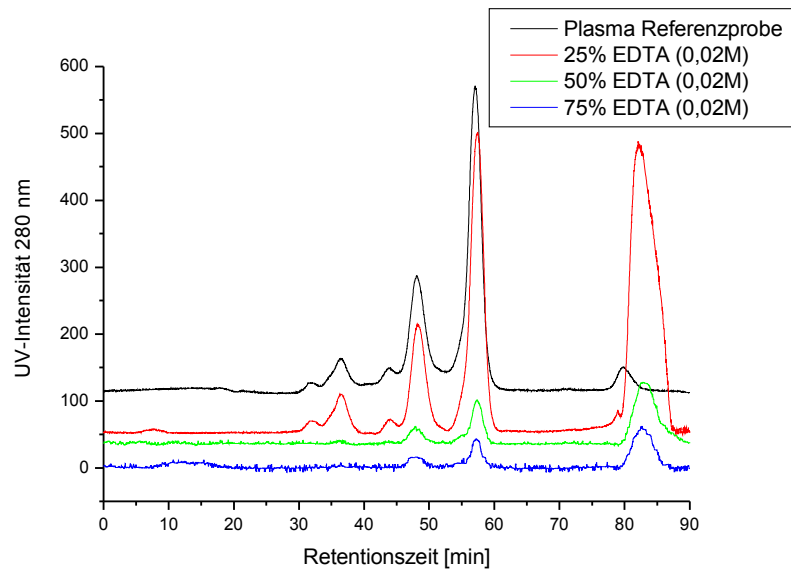


Abbildung 4.4 UV- Chromatogramme von Blutplasma mit unterschiedlichen EDTA Konzentrationen; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1

Der Vergleich der UV-Chromatogramme, welche bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wurden, zeigt eine deutliche Veränderung der hydrodynamischen Querschnitte der Proteine (25 % EDTA), was auf Veränderungen der Tertiärstruktur und den Verlust der Quatärstruktur hinweist. Des weiteren kann eine Reduktion der Signalintensität, welche mit der Zunahme der EDTA-Konzentration einhergeht, beobachtet werden. Durch die Anwesenheit von EDTA konnten ebenfalls starke Veränderungen in der Metallverteilung detektiert werden. In Abbildung 4.5 sind diese Effekte exemplarisch für das Element Kupfer dargestellt.

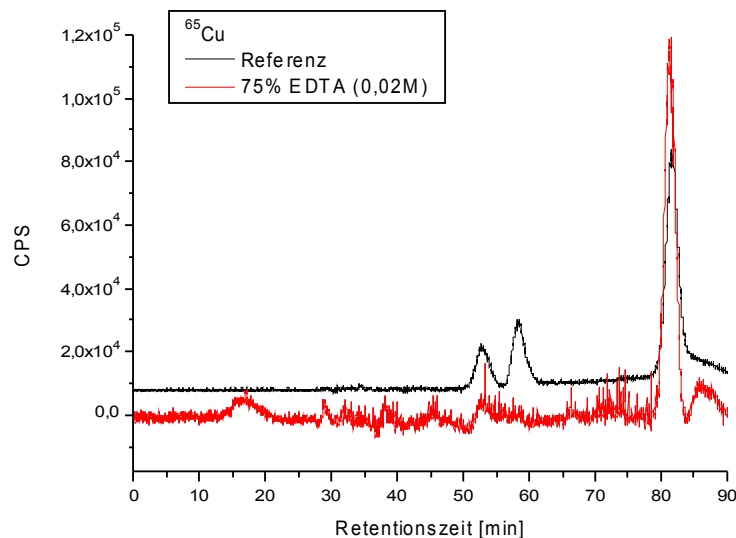


Abbildung 4.5 Cu(-) Referenz- und Cu(-) Chromatogramm mit EDTA Zusatz einer Plasmaprobe ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1

Das Referenzsignal von Kupfer, welches bei einer SEC-Trennung ohne EDTA Zugabe ermittelt wurde, zeigt drei Signale bei einer Retentionszeit von 53,2 Minuten, 58,7 Minuten und 82,8 Minuten. Durch die Addition von 15 mmol/l EDTA hingegen kann zum einen eine Erhöhung der Signalintensität bei einer Retentionszeit von 82,8 Minuten beobachtet werden. Gleichzeitig verringert sich die Intensität der Peaks bei 53,2 Minuten und 58,7 Minuten. Des weiteren konnte eine Reihe neuer Signale mit niedrigem Signal/Rauschverhältnis ($5 \text{ bis } \leq 3$), welche sich über den gesamten Trennbereich verteilen (Abbildung 4.5), detektiert werden.

Eine weitere interessante Substanz für die Metallproteinanalytik ist das Natriumdodecylsulfat (SDS), ein Detergens, welches häufig in der Gelelektrophorese eingesetzt wird. Mit Hilfe der Size-Exclusion Chromatographie wurden daher die Veränderungen der Protein- und Metallverteilung durch SDS und das etablierte Standardverfahren der Hitzedenaturierung analysiert, um die Einsatzmöglichkeiten der SDS-PAGE für die Metallproteinanalytik beurteilen zu können. Hierzu wurde Blutplasma mit 0,01 % Natriumdodecylsulfat (vg. Kapitel 3.2.4.1) versetzt. Anschließend wurde die Probe aliquotiert und ein Teil bei 90 °C für 10 Minuten hitzedenaturiert. Die Untersuchungen wurden dreifach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Daten gewährleisten zu können. Die UV-Chromatogramme einer unbehandelten Referenzprobe

und der mit SDS versetzten Analyten ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

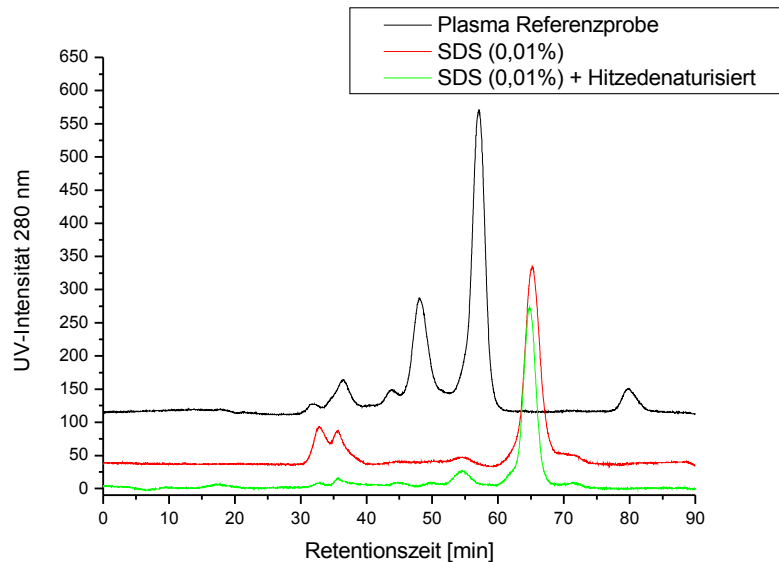


Abbildung 4.6 Vergleich der UV- Chromatogramme von Blutplasma mit SDS (-) Zusatz, SDS und Hitzedenaturiert (-) sowie einer Referenzprobe (-) ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1

Der Vergleich der Proteinsignale der Referenzprobe mit den SDS-Proben zeigt eine Verschiebung der Proteinverteilung. Die Signale im Bereich von 40 min – 60 min treten bei der mit SDS angereicherten Probe nicht mehr auf. Im Gegensatz hierzu kann ein neues Signal mit einer Retentionszeit von 65,3 Minuten beobachtet werden. Durch die zusätzliche Hitzedenaturierung verschwinden die Signale, welche zu Beginn der Chromatographie (RT= 30 min - 40 min) auftraten, fast vollständig. Die Analyse der Elementinformationen, welche durch die HPLC-ICP-MS Kopplung gewonnen wurden, lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Durch die Wiederholung der Analysen mit unterschiedlichen Plasmaproben konnten ebenfalls keine reproduzierbaren Elementinformationen gewonnen werden. In Abbildung 4.7 ist exemplarisch für Kupfer ein typisches Vergleichschromatogramm dargestellt. Die Elementsignale, welche in den mit Natriumdodecylsulfat versetzten Proben detektiert werden konnten, variieren sowohl in ihrer Signalintensität als auch in der Retentionszeit.

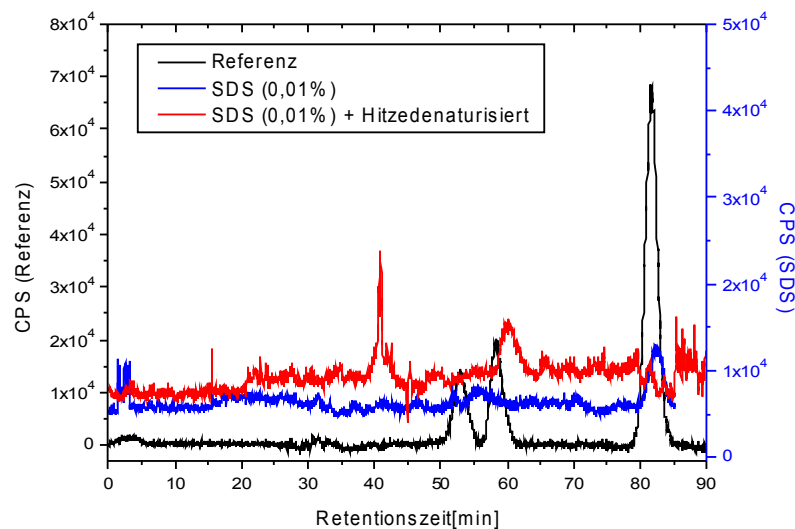


Abbildung 4.7 Vergleich der Cu Massenspur von Blutplasma mit SDS (-) Zusatz, SDS und Hitzedenaturiert (-) sowie einer Referenzprobe (-) ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1

4.3 Konzeption 1D/2D-HPLC

Für diese Arbeit wurde ein zweidimensionales HPLC-System konzipiert, welches zum einen an die Besonderheiten der Metallproteinanalytik angepasst ist, des weiteren aber ein Höchstmaß an Flexibilität bietet. Das HPLC-System besitzt zwei metallfreie unabhängig voneinander regelbare Flußwege, welche jeweils von einer Niederdruckgradientenpumpe mit integriertem Vakuumdegaser mit Laufmittel versorgt werden (Pumpe 1 und 2 Abbildung 4.8).

Der Autosampler kann mittels Motorschaltventil selektiv in einen der beiden Flußwege geschaltet werden. Hierdurch kann die Anlage als zweidimensionales System oder parallel wie zwei eindimensionale HPLC-Anlagen ohne Umbau betrieben werden. Diese Möglichkeit gewährleistet ein Höchstmaß an Flexibilität beim Einsatz des HPLC-Systems und erleichtert zudem die Methodenoptimierung, da hierbei zwei Trenntechniken unabhängig voneinander parallel optimiert werden können.

Eine „echte“ online Kopplung der ersten und zweiten Dimension wird mit Hilfe von zwei Trap-Säulen realisiert, welche alternierend in die Flußwege geschaltet werden. Des weiteren ermöglicht der Einsatz der Trap-Säulen einen Eluentenwechsel zwischen der ersten und zweiten Dimension. Beide Wege verfügen über einen UV/Vis-Detektor, welcher eine gezielte Probenübergabe in die zweite Trenndimension bzw. auf einen Fraktionssammler, ermöglicht. Da im zweidimensionalen Betrieb in der Regel im zweiten Separationsschritt kleinere Trennsäulen eingesetzt werden als im eindimensionalen Betrieb, wird das Wechseln der Säulen durch ein Säulenschaltventil im zweiten Flußweg automatisiert (Abbildung 4.8).

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein automatisiertes Kalibrationssystem für die ICP-MS und ein Interface für die online Kopplung mit der Gelelektrophorese entwickelt, welche ebenfalls in das HPLC System integriert wurden. Diese Spezifikationen werden gesondert im Kapitel 4.5.2 und 4.9.1 beschrieben.

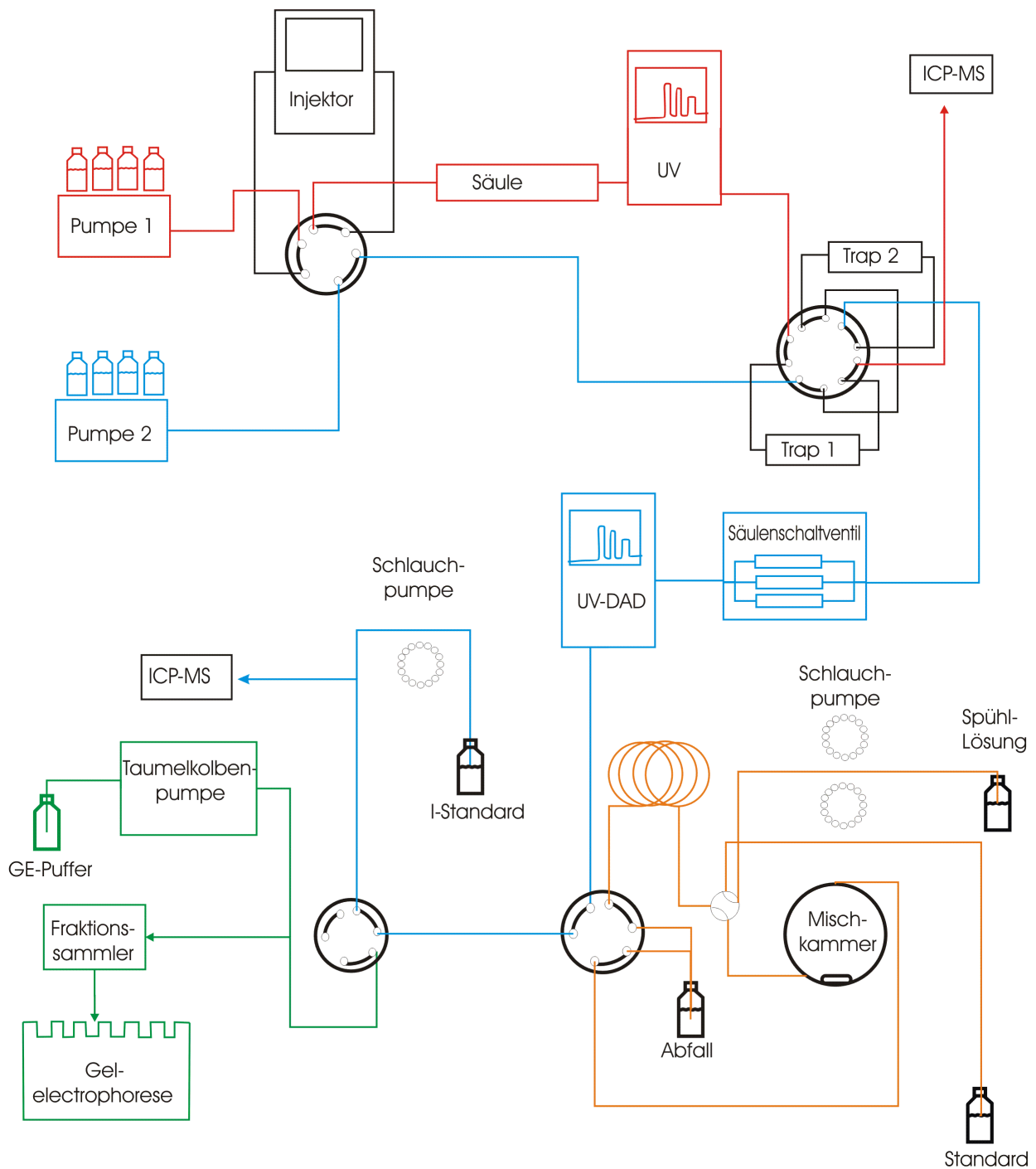


Abbildung 4.8 schematischer Aufbau der multidimensionalen HPLC

4.4 2D-HPLC Optimierung

Die Optimierung der zweidimensionalen HPLC erfolgte in zwei Schritten, wobei zunächst die Einzelkomponenten im Hinblick auf ihre Trennleistung optimiert wurden. Aufgrund der komplexen Probenmatrix von Humanblut und den daraus resultierenden Matrixeffekten, welche durch die Verwendung von Standards nur unzureichend nachempfunden werden können, wurde humanes Blutplasma für die Optimierung eingesetzt. Hierbei wurden jeweils 25 µl Blutplasma injiziert, welches zuvor mit dem jeweiligen Eluenten im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde.

4.4.1 Size-Exclusion Chromatographie

Die Methode der Size-Exclusion Chromatographie wurde bereits im Rahmen einer Diplomarbeit für die Separation von Humanblut optimiert ^[63]. Für die Anpassung an das zweidimensionale Chromatographiesystem wurden daher nur geringfügige Modifikationen der Flußrate vorgenommen, um das im Vergleich zur eindimensionalen Anlage leicht erhöhte Totvolumen ausgleichen zu können. Die Trennung erfolgte daher unter isokratischen Bedingungen mit einem Fluß von 0,3 ml/min und unter Verwendung eines Citratpuffers (pH=7,4; 40 mmol/l).

4.4.1.1 Kalibration zur Bestimmung des Molekulargewichtes

Um die Lage der Signale nach dem Chromatographielauf einem Molekulargewicht zuordnen zu können, wurden Standards mit bekanntem Molekulargewicht vermessen (Tabelle 4.3). Jede Messung wurde fünfmal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Tabelle 4.3 Kalibration der SEC

Protein	MW [kDa]	Retentionszeit Ø [min]	Standardabweichung [min]
Thyroglobulin	669	27,02	0,13
Ferritin	440	32,26	0,09
Catalase	232	37,84	0,11
LDH	140	43,30	0,10
BSA	67	51,16	0,12
Lysozym	14	82,14	0,08

Aus den ermittelten Retentionszeiten ergibt sich folgende Kalibrationsgerade :

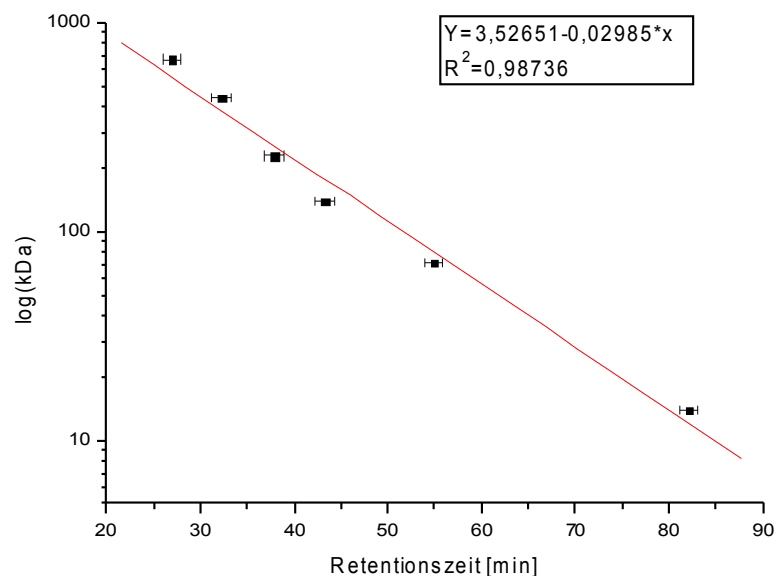


Abbildung 4.9 Kalibrationskurve verschiedener Proteinstandards und deren Standardabweichung; Fluß: 0.30 ml/min Eluent: Citratpuffer pH 7.4 , 0.04 M , Trennsäule: Tricorn Superdex 200 10/300 GL

Die Messwerte zeigen eine geringe Streuung um die Ausgleichsgerade (Abbildung 4.9). Diese Abweichungen werden durch das Trennprinzip der SEC hervorgerufen. Die SEC-Trennung ist abhängig vom hydrodynamischen Querschnitt der jeweiligen Proteine, da die Kalibration der SEC mit Hilfe der Molekulargewichte und nicht über den hydrodynamischen Querschnitt der Proteine erfolgte, treten diese Abweichungen auf. Des weiteren wird die Trennung durch hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit der

Polymermatrix der Trennsäule beeinflusst. Mit Hilfe der Standardabweichung der Retentionszeiten und des Regressionskoeffizienten kann die Genauigkeit der Kalibrationsgeraden berechnet werden. Aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit der Kalibration variiert der Fehler zwischen ± 5.8 kDa im Bereich der kleinen Massen bis zu einem Maximalfehler von ± 19.7 kDa für ein Molekulargewicht von ≤ 600 kDa.

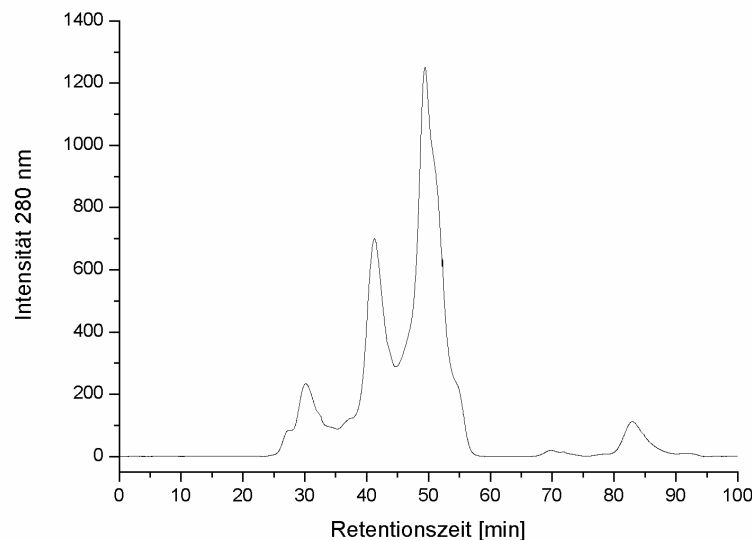


Abbildung 4.10 UV-Chromatogramm von Blutplasma (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9

Das UV Chromatogramm von Blutplasma (Abbildung 4.10), welches bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wurde, zeigt mehrere gut voneinander getrennte Proteinsignale. Die höchste Intensität der UV-Signale wurde bei den Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 70 ± 8 kDa detektiert. Dieser Größenbereich stimmt mit den Molekulargewichten von Albumin (68 kDa) ^[52] und Transferrin (72 kDa) überein. Die hohe Intensität der Signale korreliert mit dem prozentualen Anteil dieser Komponenten im Blut ^[52].

4.4.2 Anionenaustauscherchromatographie

Die Anionenaustauscherchromatographie erfolgte mit Hilfe einer Hamilton PRP-X100 (2,1mm x 50mm) Trennsäule. Für die Optimierung der Chromatographie wurde ein Tris/HCl Puffersystem mit physiologischem pH-wert verwendet (40 mmol/l pH=7,4 Puffer A). Der Gradient wurde mit Hilfe eines zweiten Puffers (Tris/HCl 40mmol/l pH=7,4) erzeugt, welcher mit 0,6 mol/l Ammoniumacetat versetzt wurde (Puffer B). Ammoniumacetat, welches in der Plasmafackel der ICP-MS nahezu vollständig zersetzt wird, wurde verwendet, um Verunreinigungen und Salzablagerungen im Massenspektrometer zu minimieren.

Zur Optimierung der Trennung wurden Plasmaproben unter Verwendung von verschiedenen Gradienten vermessen. Alle Messungen wurden mit 100% des Tris/HCl Puffers begonnen. Anschließend wurden verschiedene Gradienten eingesetzt, um die Konzentration langsam auf 100% 0,6 mol/l Ammoniumacetat/Tris/HCl und 0% Tris/HCl (pH=7,4; 0.04 M) zu senken. Hierbei wurden aufgrund der eingeschränkten Steuerungsmöglichkeiten, welche in der zweiten Trenndimension nur die Realisierung eines Kastenprofils erlaubt, nur Stufengradienten eingesetzt. In Abbildung 4.11 sind die UV-Chromatogramme und die verwendeten Gradienten einiger Optimierungsschritte abgebildet.

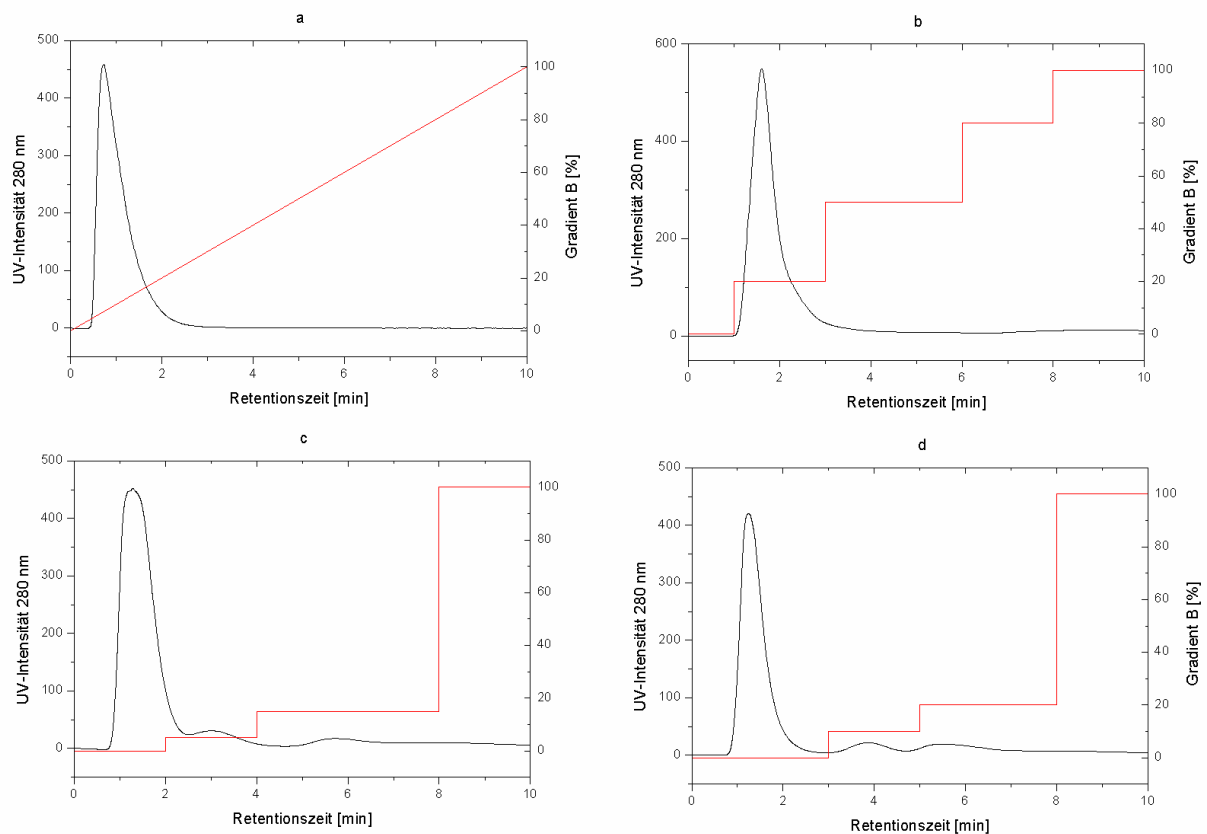


Abbildung 4.11 Optimierung der AEX (Hamilton PRP-X100; 2,1mm x 50mm) für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.2

Zunächst wurde ein Übersichtsgradient beginnend mit 100 % Puffer A, welcher linear innerhalb von 10 Minuten auf 100 % Puffer B gebracht wurde, mit einem konstanten Fluß von 0,3 ml/min eingesetzt (Abbildung 4.11 a). Durch die Veränderung des Gradienten konnte eine geringfügige Verbesserung der Trennung (Abbildung 4.11 b-d) erreicht werden. Aufgrund der geringen Retention des Analyten und der daraus resultierenden Trennleistung wurde die AEX für den Einsatz im zweidimensionalen HPLC-System nicht weiterentwickelt.

4.4.3 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Für die Optimierung der Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie wurde analog zur Anionenaustauscherchromatographie ein Tris/HCl Puffersystem mit physiologischem pH-Wert verwendet (40 mmol/l pH=7,4; Puffer A). Der Gradient wurde ebenfalls mit Hilfe eines zweiten Puffers (Tris/HCl 40 mmol/l pH 7,4 + 0,6 mol/l Ammoniumacetat; Puffer B) erzeugt. Die Optimierung der Trennung erfolgte anhand von Plasmaproben unter Verwendung von verschiedenen Ammoniumacetat Gradienten. Im Gegensatz zur Ionenaustauscher-Chromatographie wurde die Ammoniumacetat Konzentration im Laufe einer Trennung reduziert.

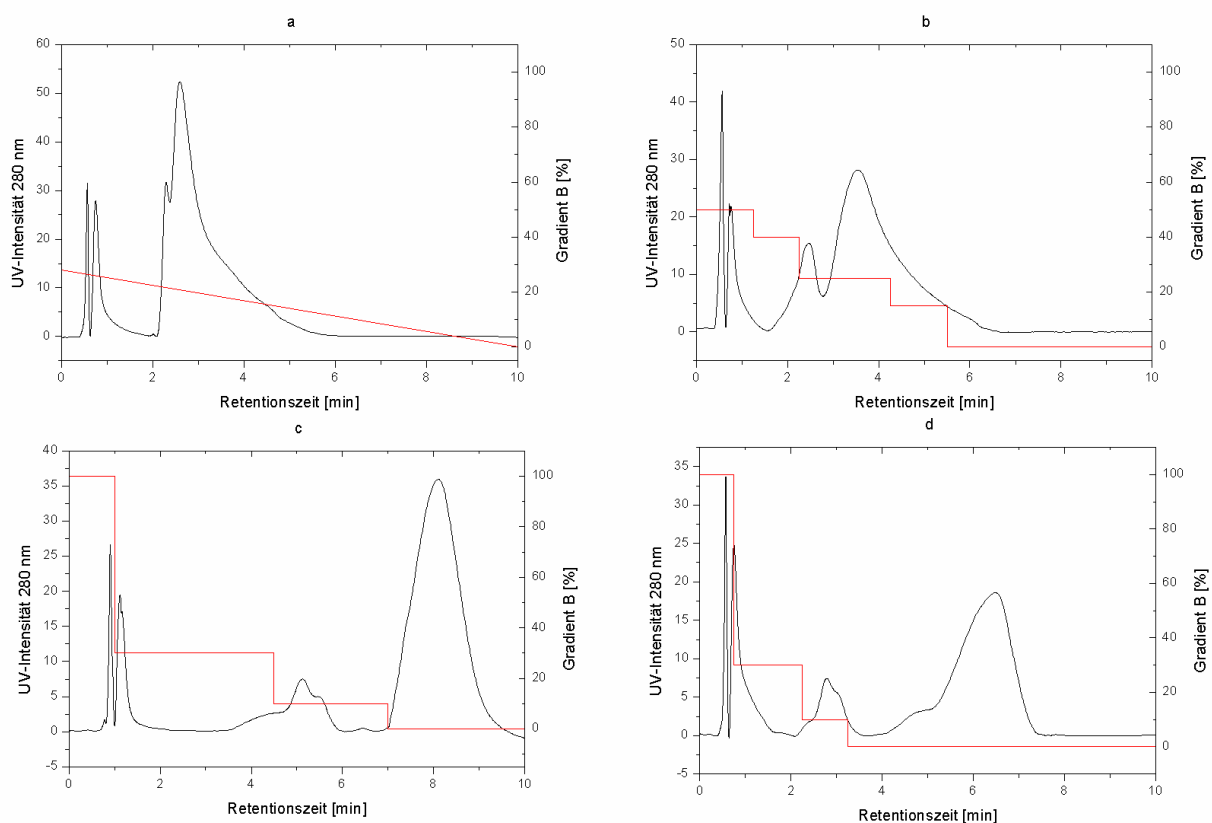


Abbildung 4.12 Optimierung der HIC (Resorce Phenyl; 2,1mm x 50mm) für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.3

In Abbildung 4.12 (a & b) sind die ersten Schritte der Optimierung und der eingesetzte Gradient dargestellt. Hierbei wurde ein Fluß von 1 ml/min verwendet. Eine signifikante Verbesserung der Trennung konnte durch die Reduktion des Eluentenstroms auf 0,3 ml/min (Abbildung 4.12 c & d) und einer nachfolgenden Anpassung des Gradienten erreicht werden. Die hohe Salzfracht zu Beginn der Separation (Abbildung 4.12 c & d) wurde als Anpassung an das zweidimensionale Trennsystem vorgenommen, da hierdurch eine vollständige Reelution von den Trap-Säulen (Kapitel 2.5 & 4.4.5) erreicht werden kann.

4.4.4 Mischbettionenaustauscher (IEX)

Für die Optimierung der Trennung von Blutplasma auf der Mischbettsäule, welche sowohl aus Anionenaustauschermaterial als auch aus Kationenaustauschermaterial besteht (siehe Kapitel 2.6 & 3.4.4), wurde ebenfalls ein Tris/HCl-Puffersystem (40 mmol/l; pH=7,4) verwendet. Aufgrund des experimentellen Aufbaus der zweidimensionalen Anlage wurden die Trennsäule der späteren zweiten Trenndimension (2,1 mm x 50 mm) und eine Trap-Säule (2,1 mm x 30 mm) nacheinander eingesetzt. Die hieraus resultierende Vergrößerung des Säulenvolumens entspricht somit einer Trennsäule von 2,1 mm x 80 mm. Abbildung 4.13 stellt den Verlauf der Methodenoptimierung exemplarisch dar. Hierbei bildet Abbildung 4.13 a den ersten Übersichtsgradienten, welcher mit einem konstanten Fluß von 0,5 ml/min durchgeführt wurde, ab. Nachdem die Varianz des Salzgradienten bei dieser Flußrate optimiert wurde (Abbildung 4.13 b) erfolgte eine Reduktion des Eluentenstroms auf 0,3 ml/min. Hierdurch konnte die Trennleistung des Systems deutlich verbessert werden (Abbildung 4.13 c & d)

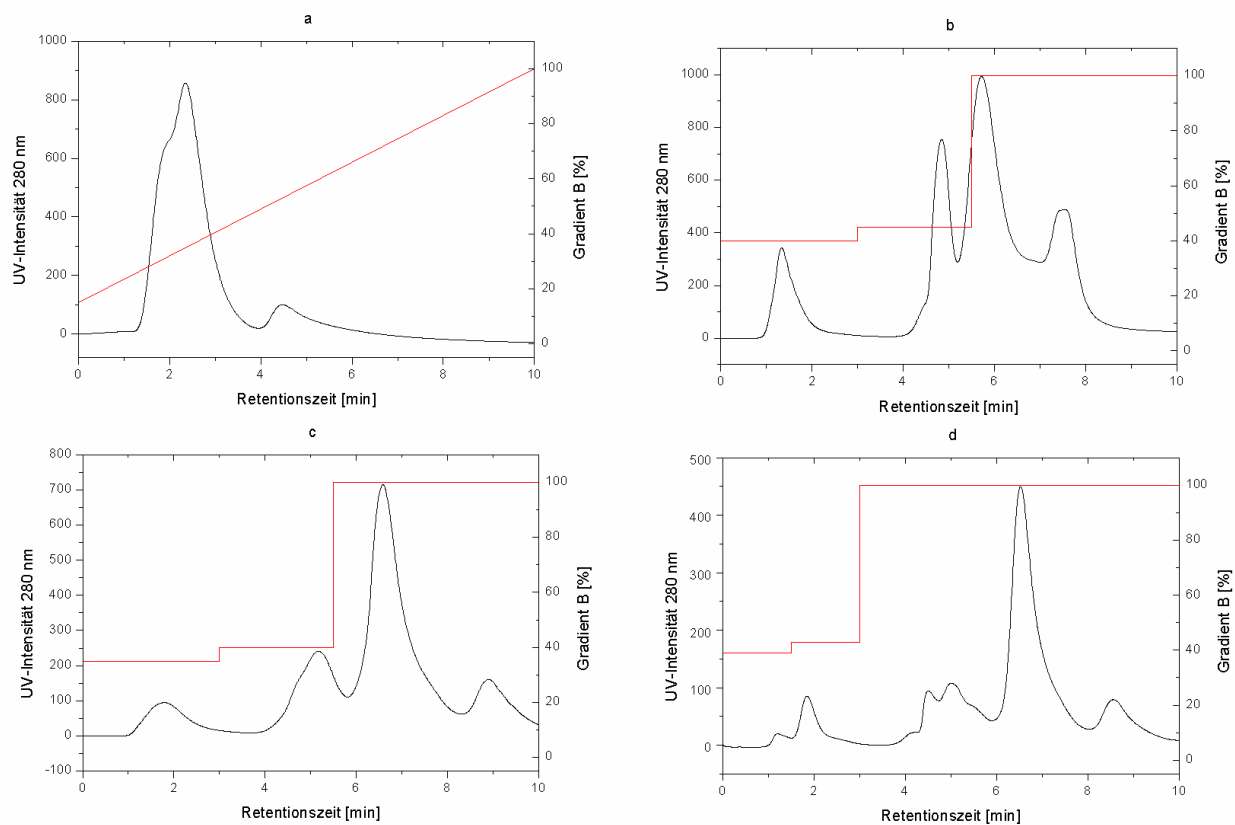


Abbildung 4.13 Optimierung der IEX für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.4

4.4.5 Trap-System

Für den Einsatz von online gekoppelten zweidimensionalen Chromatographiesystemen ist die Qualität und Quantität des Probentransports vom ersten auf den zweiten Separationsschritt von entscheidender Bedeutung. Die verwendete zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie ist mit einem Trap-System, welches aus zwei IEX-Säulen und einem Motorschaltventil besteht, ausgerüstet. Die Mischbettsäulen wurden als Trap-Säulen eingesetzt, da hierbei im Gegensatz zu reinen Anionen- oder Kationenaustauschern ein größeres Spektrum an Proteinen retendiert werden kann. Hierdurch wird es ermöglicht, alle geladenen Metall-Protein Assoziationen zweidimensional zu analysieren.

Die Leistungsfähigkeit dieses Systems wurde zunächst mit Hilfe von Proteinstandards (Tabelle 4.4) charakterisiert. Hierzu wurden die Standards einzeln in bekannter

Konzentration und unter Verwendung des Citratpuffers (40 mmol/l; pH=7,4), welcher als Laufmittel in der ersten Trenndimension eingesetzt wird, auf die Trap-Säulen aufgebracht. Anschließend wurden die Säulen in den Flußweg der zweiten Trenndimension geschaltet und mit einem Tris/HCl-Puffer (pH=7,4; 40 mmol/l), welcher mit 0,6 mol/l Ammoniumacetat versetzt wurde eluiert. Der Gesamtproteingehalt des Eluates der ersten und der zweiten Trenndimension sowie einer Kontrollprobe wurden mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 3.6) bestimmt. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Analysen je Protein und Trap-Säule fünffach durchgeführt. Die Aufgabemengen sowie die Wiederfindung nach dem Trap-Prozess und die isoelektrischen Punkte (PI) der Proteine sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4 Charakterisierung des Trap-Systems

Protein	PI	Konzentration (Probe) [mg/ml]	Aufgabemenge [mg]	Wiederfindung [mg]	Wiederfindung [%]
Trap 1					
Alkalische Phosphatase	4,6	8,4	0,43	0,35 ± 0,08	80 ± 2,1
BSA	4,9	7,2	0,37	0,23 ± 0,06	63 ± 2,8
HSA	5,85	9,1	0,46	0,19 ± 0,06	42 ± 3,2
Cytochrom C	9,28	5,4	0,28	0,15 ± 0,04	52 ± 2,6
Lysozym	11,0	9,4	0,48	0,39 ± 0,07	82 ± 1,7
Trap 2					
Alkalische Phosphatase	4,6	8,4	0,43	0,34 ± 0,08	79 ± 1,8
BSA	4,9	7,2	0,37	0,25 ± 0,06	67 ± 3,0
HSA	5,85	9,1	0,46	0,22 ± 0,06	47 ± 3,1
Cytochrom C	9,28	5,4	0,28	0,17 ± 0,04	60 ± 2,5
Lysozym	11,0	9,4	0,48	0,38 ± 0,07	79 ± 2,1

Die Quantifizierungsdaten der beiden präparierten Trap-Säulen (siehe Kapitel 3.4.2) korrelieren für die jeweiligen Proteinstandards, was auf äquivalente Trap-Eigenschaften der eingesetzten Säulen schließen lässt. Des weiteren ist eine Abhängigkeit der Trap-Effektivität vom isoelektrischen Punkt der Proteine zu beobachten. In Abbildung 4.14 wurden die Wiederfindungsraten gegen die isoelektrischen Punkte der Analyten

aufgetragen. Anschließend wurde eine Gaußfunktion über die Datenpunkte gelegt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Proteinen in wässrigen Lösungen, deren pH-Wert dem isoelektrischen Punkt des Proteins entspricht, konnte kein Proteinstandard mit einem $pI = 7,4$ analysiert werden. Hierdurch ist es nicht möglich das Minimum der Gaußfunktion exakt zu bestimmen. Ein weiterer limitierender Faktor ist die geringen Datendichte, welche eine Abhängigkeit in Form eines Polynoms zweiten Grades nicht ausschließt. Daher kann die Ausgleichsfunktion lediglich eine Tendenz aufzeigen. Hieraus ist ein Anstieg der Trap-Effektivität, welcher mit steigendem Abstand des isoelektrischen Punktes vom pH-Wert des Puffers der ersten Trenndimension einhergeht, ersichtlich.

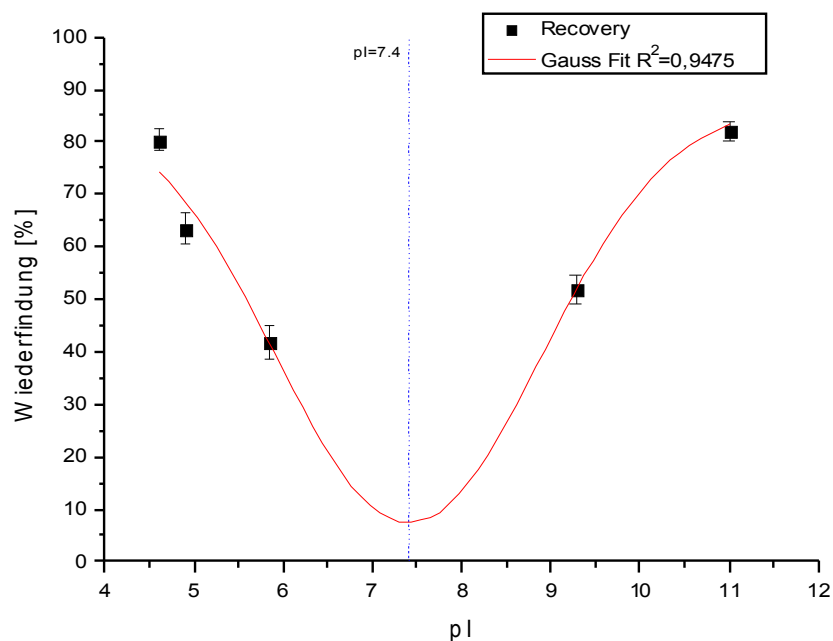


Abbildung 4.14 Trap-Effektivität in Abhängigkeit vom pI des Analyten

4.5 Elementkalibration

Die Kalibration der ICP-MS mit vorgeschalteter zweidimensionaler HPLC gestaltet sich aus verschiedenen Gründen sehr schwierig. Zum einen sind sehr wenig Metallproteinstandards in ausreichender Reinheit kommerziell erhältlich, zum anderen wird angestrebt, die 2D-HPLC für die Analyse von Realproben einzusetzen. Hierbei sind die Spezies häufig unbekannt, was den Einsatz von Proteinstandards unmöglich macht. Da die ICP-MS ein elementsensitiver Detektor ist und mit der Ionisierung ebenfalls eine Atomisierung einher geht, was zum Verlust der Spezies Eigenschaften führt, wurde die Kalibration mit anorganischen Metallstandards durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Probenschleife verwendet, welche mit Hilfe eines Motorschaltventils zwischen UV-Detektor der HPLC und dem Zerstäuber der ICP-MS geschaltet wurde und extern gefüllt werden kann (Abbildung 4.15).

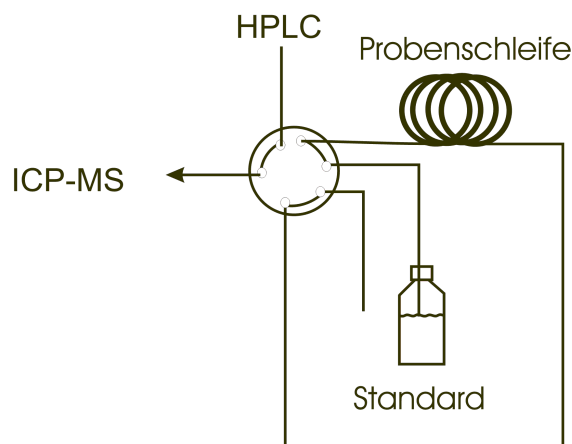


Abbildung 4.15 Versuchsaufbau externe Kalibration

Dieser Versuchsaufbau verringert die Kontamination der HPLC mit Metallstandards, was bei den Analysen zu Artefaktbildungen und Memoryeffekten führen würde. Für die Kalibration wurde eine Multielement-Kalibrationsreihe (0,1 µg/l; 0,3 µg/l; 1 µg/l; 3 µg/l; 10 µg/l; 30 µg/l; 100 µg/l; 300 µg/l) mit den analysierten Elementen angesetzt und vermessen. Der zeitliche Aufwand für diese externe Kalibrationstechnik stellt jedoch aufgrund der erforderlichen Reinigung der Probenschleife, welche nach jeder Konzentrationsstufe erfolgte, mit ca. zwei Stunden

einen limitierenden Faktor für den maximalen Probendurchsatz pro Messtag dar. Für die Analytik wurde daher eine alternative automatisierbare Kalibrationstechnik entwickelt.

4.5.1 Theoretische Berechnung der Fast Gradient Calibration

Im Gegensatz zur klassischen externen Kalibration, welche mit verschiedenen Konzentrationsstufen arbeitet, verwendet die FGC (Fast Gradient Calibration) einen Konzentrationsgradienten. Der Konzentrationsgradient wird mit Hilfe einer Mischzelle mit Magnetrührer erzeugt, welche über die Schlauchpumpe der ICP-MS direkt an den Zerstäuber des Massenspektrometers gekoppelt wird (Abbildung 4.16).

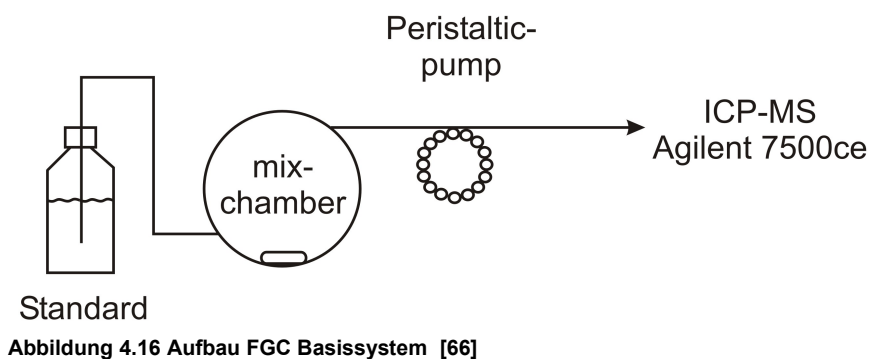


Abbildung 4.16 Aufbau FGC Basissystem [66]

Zur Gerätekalibration wird die Mischzelle zunächst mit Flüssigkeit gefüllt. Anschließend wird durch kontinuierliche Zugabe des Kalibrationsstandards aus einem Vorratsdepot mit der gewünschten Maximalkonzentration der Kalibration, der Gradient erzeugt. Für die Auswertung der so erhaltenen Messdaten ist es unerlässlich, die Konzentration am Ausgang der Mischzelle in Abhängigkeit von der Zeit berechnen zu können. Aufgrund der Zellgeometrie, des geringen Innenvolumens (1-3 ml) und der nahezu idealen Durchmischung in der Mischkammer, kann dieses System als Spezialfall eines idealen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktors (CSTR) betrachtet werden ^[65,66].

Gleichung 2 ^[65] beschreibt die Abhängigkeiten des Zellvolumens (V), der Konzentration des Standards (C_{in}) und des Volumenflusses ($\dot{V} = dV/dt$). C_{out} ist die Konzentration am Zellausgang zum Zeitpunkt t . Des weiteren wird mit dem Parameter R ein Reaktionsterm eingeführt ^[65,67]. Der rechte Teil der Gleichung beschreibt die zeitabhängige Volumenänderung des Standards in der Mischzelle.

$$\dot{V}(C_{in} - C_{out}) + V \cdot R = \frac{d(V C_{out})}{dt}$$

Gleichung 2

Für die Gradientenerzeugung wird lediglich ein Verdünnungsschritt und keine chemische Reaktion durchgeführt, daher kann der Reaktionsterm entfallen ($R=0$). Des weiteren besitzt die Mischzelle ein konstantes Innenvolumen ($V = \text{konstant}$), welches zum Kalibrationsbeginn keinen Standard enthält ($C_{out}=0$ bei $t=0$). Aufgrund dieser Ausgangsbedingungen und der Einführung der mittleren Verweilzeit τ ($\tau = V/\dot{V}$) kann Gleichung 2 vereinfacht werden:

$$\frac{1}{\tau}(C_{in} - C_{out}) - \frac{dC_{out}}{dt} = 0$$

Gleichung 3

Die Lösung dieser Differentialgleichung (Gl.:3) liefert Gleichung 4;

$$\frac{C_{out}}{C_{in}} = \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]$$

Gleichung 4

Nachdem Gleichung 4 umgestellt (Gl.:5) und τ durch V/\dot{V} substituiert wurde, kann die Konzentration am Zellausgang in Abhängigkeit von der Zeit berechnet werden:

$$C_{out} = \left[1 - \exp \left(- \frac{t \cdot \dot{V}}{V} \right) \right] \cdot C_{in}$$

Gleichung 5

Um mit Hilfe der berechneten Konzentration und den Messdaten der ICP-MS eine Kalibration durchführen zu können, ist nun noch ein Korrekturfaktor für die Zeit erforderlich, welche die Kalibrationslösung vom Zellausgang bis zum Detektor benötigt. Dieser kann über die Flussdaten und die eingesetzte Kapillare ermittelt werden.

4.5.2 Technische Umsetzung

Für die ersten Vorversuche mit der Gradientenkalibrationstechnik wurde eine Glasmischzelle mit einem Zellvolumen von 3,0031 ml verwendet. Der Versuchsaufbau entspricht Abbildung 4.16. Die Integration des Kalibrationssystems in die vorhandene HPLC erfolgt durch die Verwendung eines Motorschaltventils, welches die Zuschaltung der Kalibrationseinheit in den Flußweg der HPLC erlaubt (Abbildung 4.17). Des weiteren wurde der Vorratsbehälter für den Standard durch eine Probenschleife ersetzt, welche durch den Einsatz eines 2-Wege Ventils genauso wie die Mischzelle mit Hilfe einer Schlauchpumpe gefüllt und gespült werden kann (Abbildung 4.17).

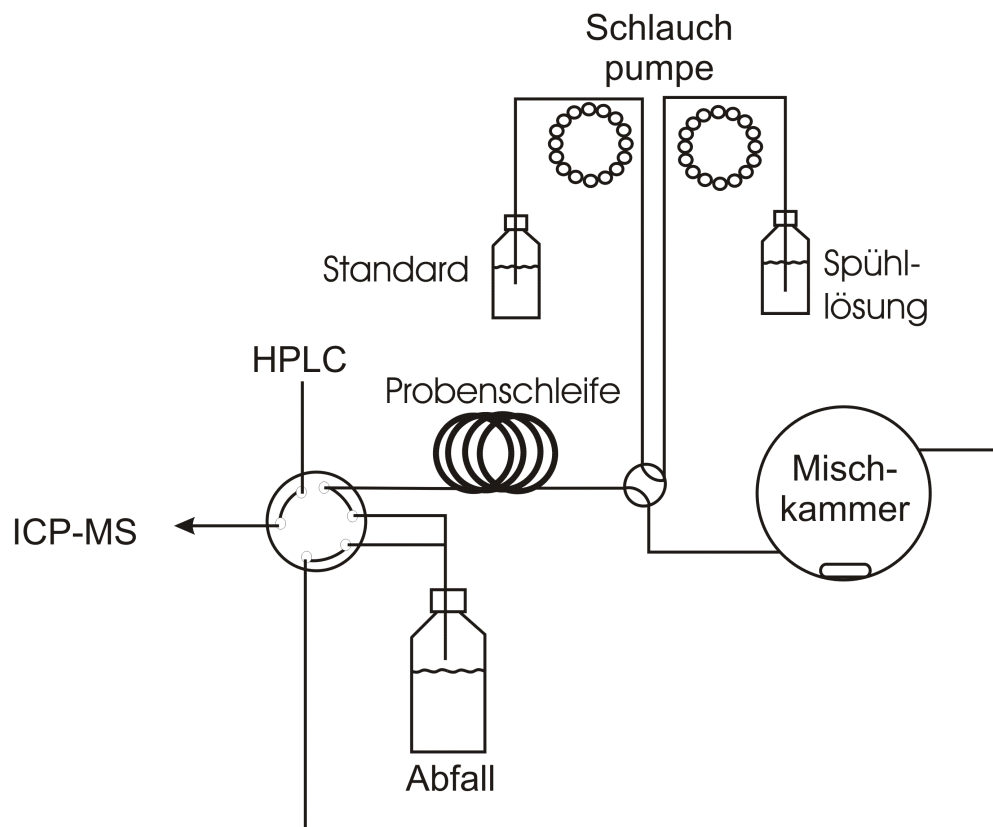


Abbildung 4.17 Aufbau FGC/FDGC-HPLC

Durch den Einsatz der Probenschleife kann eine Rückvermischung des in der Schleife befindlichen Standards mit dem von der HPLC zuströmenden Eluenten entstehen. Um hieraus resultierende Fehler bei der Kalibration zu vermeiden, werden beide Flüssigkeiten durch eine beim Befüllen der Probenschleife eingebrachte Luftblase voneinander getrennt. Für dieses System wurde eine neue Mischzelle aus Polyoxymethylen (POM), bestehend aus zwei Halbschalenelementen (Abbildung 4.18) mit integrierten Anschlüssen verwendet. Hierdurch konnte ein kleineres Zellvolumen ($1,003 \pm 0,004$ ml) und kürzere Kalibrationszeiten realisiert werden. Aufgrund der Halbschalenkonstruktion wird die Reinigung der Zelle deutlich vereinfacht.

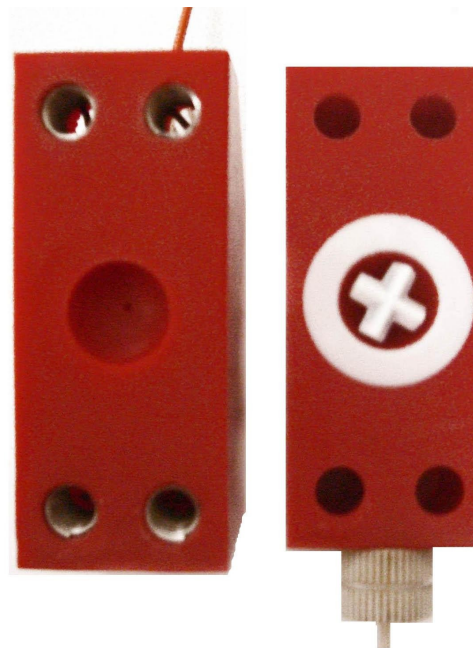


Abbildung 4.18 FGC-Mischzelle

4.5.3 Bestimmung des Zellvolumens

Die experimentelle Bestimmung des Zellvolumens erfolgte durch Differenzwägung. Hierzu wurde zuerst die leere Mischkammer mit eingesetztem Magnetrührer gewogen. Anschließend wurde die Zelle mit Reinstwasser gefüllt, welches bei Raumtemperatur annähernd eine Dichte von 1 kg/l besitzt, und erneut gewogen. Durch die Differenz kann das Zellvolumen direkt bestimmt werden. Die Messung wurde fünf mal wiederholt um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. In Tabelle 4.5 sind die experimentell ermittelten Daten dargestellt. Hieraus ergibt sich ein Zellvolumen von 1,003 ml welches mit einer Standardabweichung von $\pm 0,003$ ml ermittelt wurde.

Tabelle 4.5 Bestimmung Zellvolumen der FGC-Mischzelle

Messung	Leergewicht [g]	Zelle gefüllt [g]	Differenz [g]
1	2,7986	3,8066	1,008
2	2,7901	3,7921	1,002
3	2,7982	3,7972	1,004
4	2,7993	3,8033	0,999
5	2,7981	3,7991	1,001

Durch die Kombination der Standardabweichung mit dem Messfehler der Analysenwaage (AC-210-S Analytic, Sartorius, Göttingen, Deutschland), welcher mit $\pm 0,0005$ g angegeben ist, ergibt sich ein Gesamtfehler für das Zellvolumen von $\pm 0,4$ % oder ± 4 μ l.

4.5.4 Validierung

Die Fast Gradient Calibration basiert auf der Berechnung des Konzentrationsgradienten und somit der Konzentration am Ausgang der Mischzelle, welche exponentiell von der Zeit abhängig ist (vgl. Gleichung 5). Abbildung 4.19 zeigt die theoretische Konzentrationsänderung für ein Zellvolumen von 1,003 ml, einem Fluß von 0,25 ml/min und einer Standardkonzentration von 500 μ g/l.

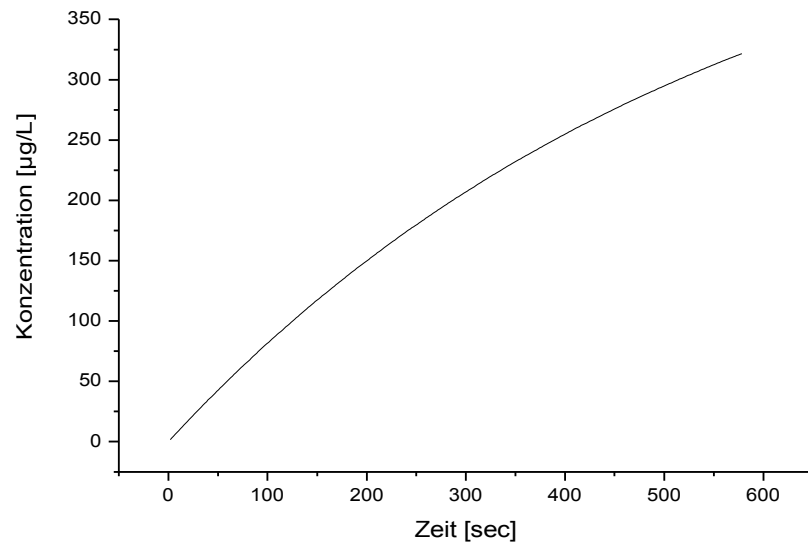


Abbildung 4.19 theoretischer Konzentrationsverlauf der FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 500 µg/l)

Der Vergleich des berechneten Konzentrationsverlaufs mit dem experimentell ermittelten Daten (Abbildung 4.20), welche mit identischen Ausgangsparametern (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 500 µg/l) aufgenommen wurde, zeigt eine gute Übereinstimmung.

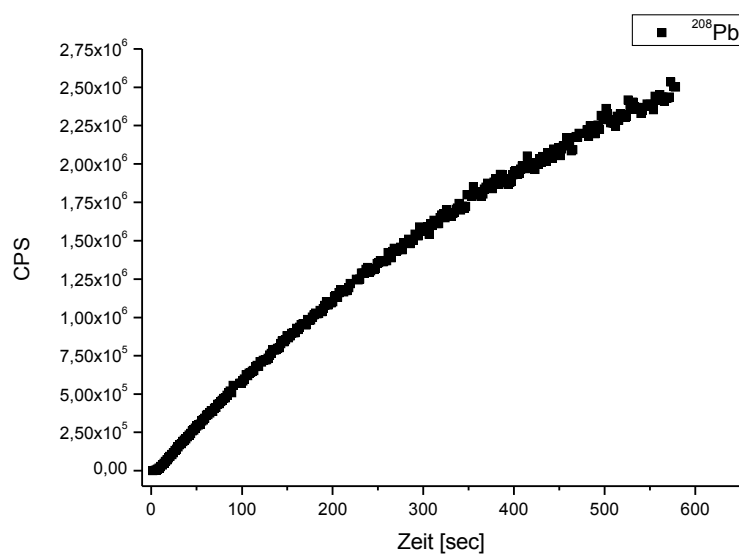


Abbildung 4.20 experimenteller Konzentrationsverlauf der FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 500 µg/l)

Durch die Kombination der berechneten Konzentration und den Messdaten der ICP-MS kann nun eine Kalibrationsfunktion ermittelt werden, welche die erwartete lineare Abhängigkeit widerspiegelt (Abbildung 4.21).

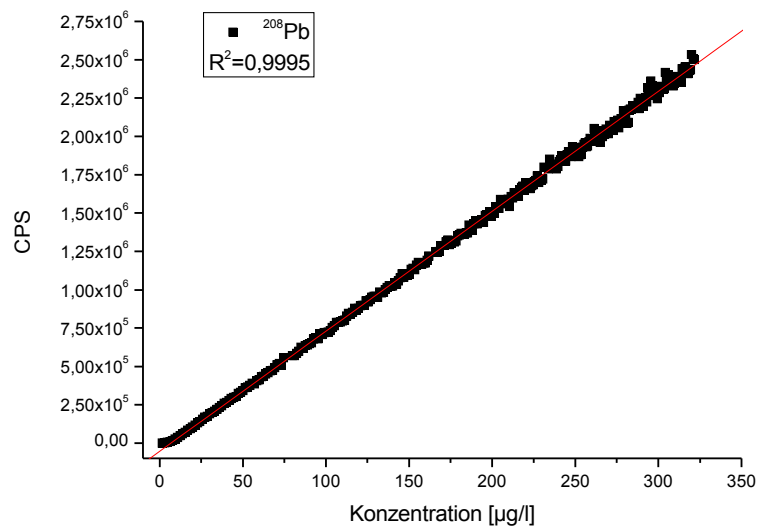


Abbildung 4.21 Kalibrationsfunktion FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 350 µg/l)

Um die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Methode überprüfen zu können, wurde die etablierte externe Kalibration mit der FGC verglichen. Hierzu wurde eine Kalibrationsreihe (0,1 µg/l, 0,3 µg/l, 1 µg/l, 3 µg/l, 10 µg/l, 30 µg/l, 100 µg/l, 300 µg/l) erstellt und die FGC vermessen. In Abbildung 4.22 sind exemplarisch für das Element Cadmium die Ergebnisse der externen Kalibration und der FGC dargestellt.

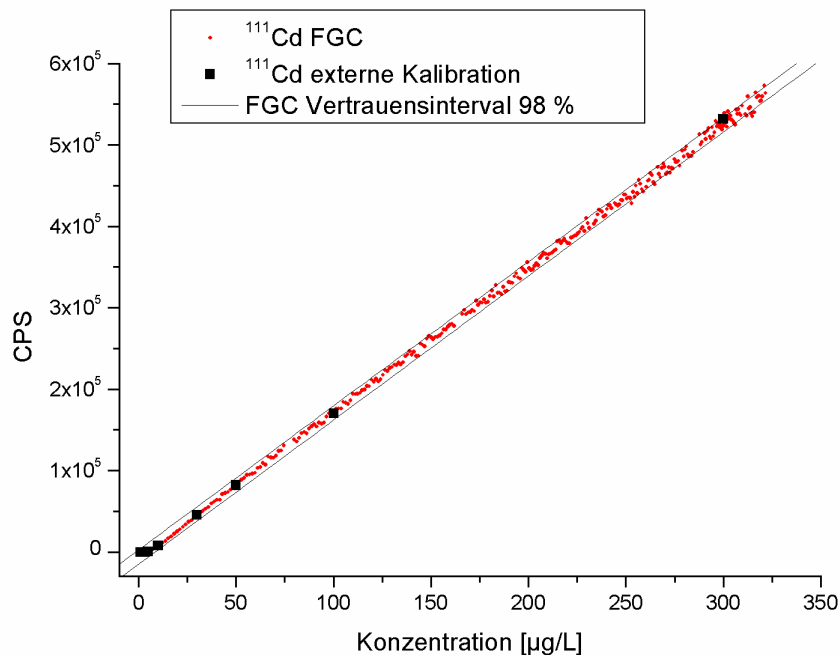


Abbildung 4.22 Vergleich externe Kalibration und FGC Methode

Hierbei kann beobachtet werden, dass alle Datenpunkte der externen Kalibration innerhalb des 98% Vertrauensintervalls der Gradientenkalibration liegen.

Die Fast Gradient Calibration Technik wurde für den Einsatz in der Gesamtmetallbestimmung und für den semiautomatisierten Betrieb in Verbindung mit der HPLC-ICP-MS Kopplung validiert. Für die Gesamtmetallbestimmung wurde ein matrixarmer zertifizierter Grundwasserstandard als Referenzmaterial analysiert. Die Kalibration wurde mit Hilfe des Basisaufbaus der Kalibrationseinheit (Abbildung 4.16) und einem Multielementstandard (300 µg/l ; Al, Cu, As, Cd, Pb), welcher aus den einzelnen Elementstandards erzeugt wurde, durchgeführt. Für die interne Standardisierung wurden die Elemente Gallium, Indium und Tallium (10 µg/l) verwendet. Die Mittelwerte aus fünf separat kalibrierten Analysen, die resultierenden Fehler, der Regressionskoeffizient der Kalibrationsgeraden und die zertifizierten Konzentrationen des Referenzmaterials sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6 Validierung der FGC für die Gesamtmetallanalytik

Element	BCR		FGC		
	Konzentration (zertifiziert) [µg/l]	Unsicherheit [µg/l]	Konzentration [µg/l]	Unsicherheit [µg/l]	R ²
²⁷ Al	159	4	157	4,3	0,9988
⁶³ Cu	45,7	1,5	45,1	1,8	0,9994
⁶⁵ Cu	45,7	1,5	45,0	1,8	0,9989
⁷⁵ As	10,8	1,4	10,7	1,6	0,9995
¹¹¹ Cd	2,94	0,08	2,88	0,1	0,9995
¹¹⁴ Cd	2,94	0,08	2,87	0,1	0,9998
²⁰⁷ Pb	7,78	0,13	7,75	0,15	0,9995
²⁰⁸ Pb	7,78	0,13	7,75	0,15	0,9995

Die Validierung des semiautomatisierten und in die HPLC integrierten FGC-Systems (Abbildung 2.10) erfolgte mit Hilfe eines zertifizierten Vollblutstandards (Seronom II). Hierzu wurden fünf Aliquote der Probe mit Citratpuffer verdünnt (40 mmol/l ; pH=7,4; Probe 1: Puffer 5) und jeweils 25 µl in das HPLC-System injiziert. Die eindimensionale Separation erfolgte mit Hilfe der Size-Exclusion Chromatographie. Das UV-Chromatogramm der Probe, welches bei einer Wellenlänge von 225 nm aufgenommen wurde, ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Aufgrund der Metallanreicherung der Blutprobe durch den Hersteller des Referenzmaterials wurden Korrelationen aller detektierten UV-Signale mit Elementsignalen beobachtet.

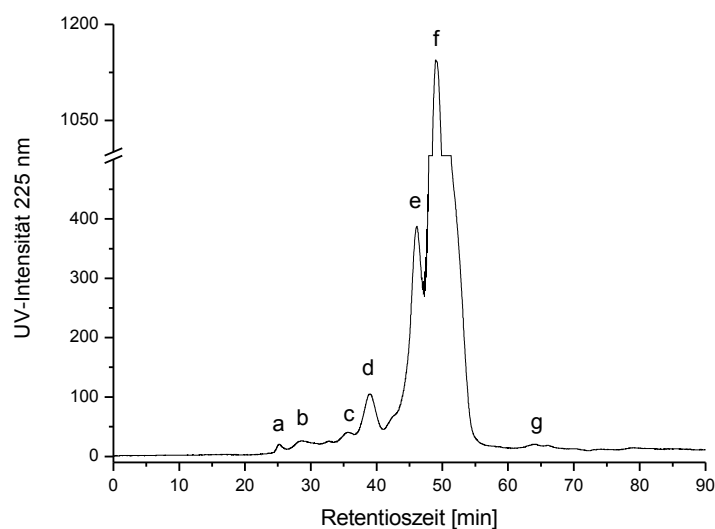


Abbildung 4.23 UV-Chromatogram von Blut (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9

In Tabelle 4.7 sind diese Korrelationen sowie die Mittelwerte^[64] aus fünf separat kalibrierten Analysen, die resultierende Wiederfindung, der Regressionskoeffizient der Kalibrationsgeraden und die zertifizierten Konzentrationen des Referenzmaterials zusammengefasst.

Tabelle 4.7 Validierung der FGC für die HPLC-ICP-MS Kopplung

Seronorm Blut II			HPLC-FGC-ICP-MS			
Element	Konzentration (zertifiziert) [µg/l]	Unsicherheit [µg/l]	Konzentration [µg/l]	Wiederfindung [%]	Peak	R ²
⁵⁹ Co	5,2	4,6 - 5,8	4,3	83	g	0,9996
⁶⁰ Ni	6,8	5,1 - 8,6	5,5	81	e+f	0,9995
⁷⁵ As	11,2	10,5 - 11,8	10,5	94	f	0,9984
¹¹¹ Cd	5,4	4,8 - 6,0	4,7	87	d	0,9994
¹¹⁴ Cd	5,4	4,8 - 6,0	4,6	86	d	0,9987
²⁰⁷ Pb	395	337 - 417	363	92	c+e+f	0,9994
²⁰⁸ Pb	395	337 - 417	362	92	c+e+f	0,9995
²⁰⁹ Bi	5,1	4,6 - 5,5	4,1	81	a+b+g	0,9991

Die Kalibrationsdaten der Validierungsexperimente zeigten Limitierungen der FGC im Bezug auf den Kalibrationsbereich. So konnte beobachtet werden, dass sich die Anzahl der Datenpunkte im unteren Bereich der Kalibration (Abbildung 4.26) bei steigender Konzentration des zudosierten Standards deutlich verringert. Dieser Effekt wird durch die Zeitauflösung des Massenspektrometers beeinflusst. Daher kann der Kalibrationsbereich von 4 Größenordnungen (bei 15 Massen und 0,1 s Integrationszeit) durch die Reduktion der Integrationszeit oder durch die Verringerung der analysierten Massen erweitert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Ausweitung des Kalibrationsbereiches ist eine Verringerung des Konzentrationsanstiegs zu Beginn der Gradientenkalibration. Hierzu wurde die FGC-Technik weiterentwickelt, indem neben dem Konzentrationsgradient ein Flußgradient etabliert wurde.

Für die Berechnung der Konzentration ist somit eine Modifikation von Gleichung 5 erforderlich. Der konstante Volumenfluss \dot{V} wird durch den Ausdruck $\Delta\dot{V} \cdot t + \dot{V}_0$ substituiert ($\Delta\dot{V}$ = Änderung des Volumenflusses pro Zeiteinheit; t = Zeit; \dot{V}_0 = Volumenfluß zum Startzeitpunkt). Hieraus ergibt sich Gleichung 6.

$$C_{out} = \left[1 - \exp \left(- \frac{t \cdot (\Delta\dot{V} \cdot t + \dot{V}_0)}{V} \right) \right] \cdot C_{in}$$

Gleichung 6

Des weiteren wird die Zerstäubereffizienz der ICP-MS durch Flussänderungen beeinflusst ^[39,68], was eine Kalibration des Massenspektrometers unter Verwendung eines Flussgradienten nahezu ausschließt. Daher wurde eine totvolumenfreie Endkopplungseinheit entwickelt, welche einen konstanten Fluß in den Zerstäuber sicherstellt (Abbildung 4.24). Der Entkoppler besteht aus einer Kapillare mit einer Einkerbung, welche in einer Halterung über einem Auffanggefäß fixiert ist. Ein Ende der Kapillare wird an die Schlauchpumpe der ICP-MS, welche mit einem konstanten Fluß das Laufmittel ansaugt, angeschlossen. Durch das andere Kapillarende wird der Eluent der HPLC zugeführt.

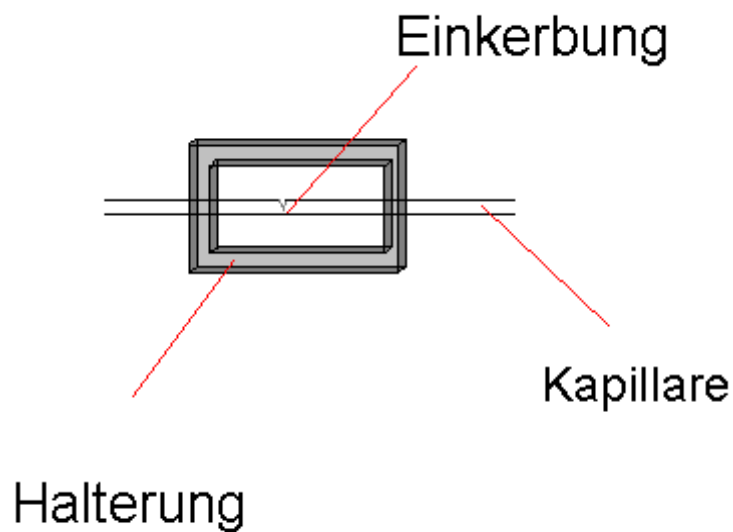


Abbildung 4.24 Aufbau Flußentkoppler

Zum Startzeitpunkt der Kalibration ist die Ansaugleistung der Schlauchpumpe identisch mit dem Fluß der HPLC. Wenn der Eluentenstrom der HPLC ansteigt und die Ansaugleistung der Schlauchpumpe übersteigt, kann das überschüssige Volumen durch die Einkerbung austreten, was einen konstanten Volumenfluss in den Zerstäuber der ICP-MS gewährleistet. In Abbildung 4.25 ist exemplarisch für das Element Kupfer die Wirkung des Entkopplers dargestellt.

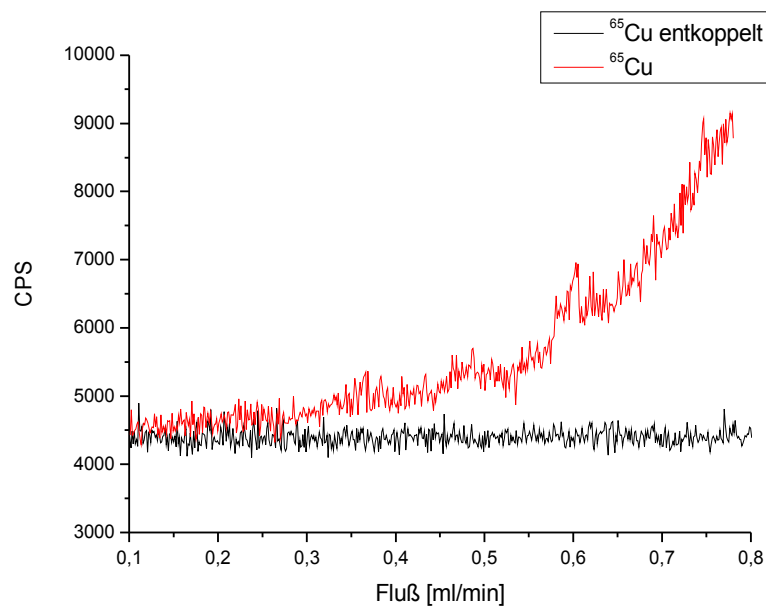


Abbildung 4.25 Vergleich der Signalintensitäten von Cu bei konstanter Konzentration und variierenden (0,05 ml/min²) Fluß mit (-) und ohne (-) Entkoppler

Die Auswirkungen des Flußgradienten auf die Datendichte im niedrigen Kalibrationsbereich kann durch den Vergleich mit einer Kalibration unter konstantem Volumenstrom veranschaulicht werden. Beide Kalibrationen wurden mit einem 1 ppm Standard durchgeführt. Hierbei wurden neben dem aufgeführten Platin Signal 15 weitere Massen aufgenommen. Des weiteren wurde zum einen ein statischer Volumenfluss von 0,3 ml/min (Abbildung 4.26) und zum anderen ein Flußgradient beginnend mit 0,1 ml/min und einer Steigerungsrate von 0,05 ml/min² (Abbildung 4.27) eingesetzt. Um den unteren Datenbereich besser beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse doppellogarithmisch in Abbildung 4.26 und 4.27 dargestellt.

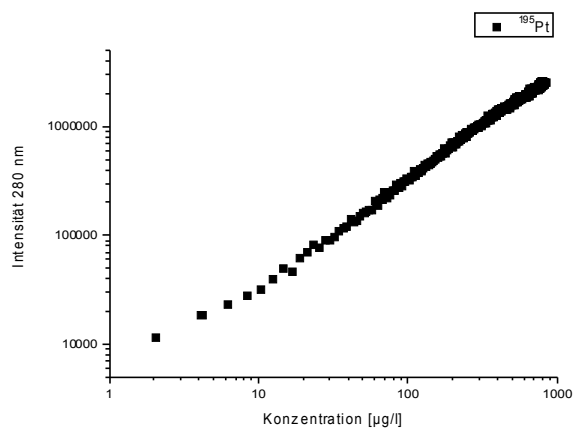


Abbildung 4.26 FGC Kalibrationsfunktion (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,30 ml/min, Standardkonzentration: 1000 µg/l)

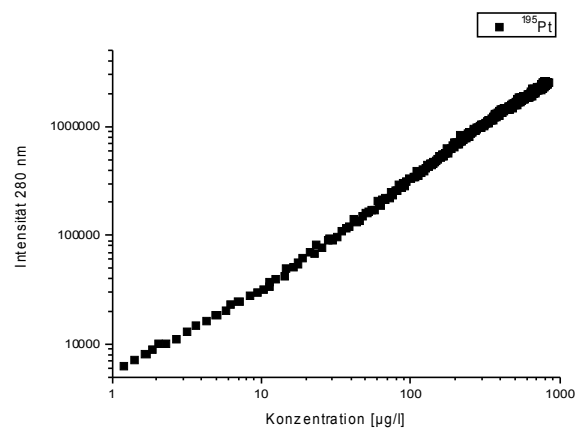


Abbildung 4.27 FDGC Kalibrationsfunktion (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,1 ml/min Steigerung: 0,05 ml/min² Standardkonzentration: 1000 µg/l)

Der Vergleich der unteren Kalibrationsbereiche (1-50 µg/l) zeigt eine deutlich erhöhte Datendichte bei der Messung mit Flußgradient.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Validierungsexperimente der Fast Gradient Calibration unter Verwendung eines zusätzlichen Flußgradienten wiederholt. Für die FDGC (Fast Double Gradient Calibration) wurde der Fluß von 0,1 ml/min mit einer konstanten Steigerungsrate von 0,05 ml/min² innerhalb von 10 Minuten auf 0,6 ml/min gesteigert.

Die Kalibration wurde hierbei mit einem Multielementstandard (300 µg/l ; Al, Cu, As, Cd, Pb), welcher aus den einzelnen Elementstandards erzeugt wurde durchgeführt. Für die interne Standardisierung wurden die Elemente Gallium, Indium und Tallium (10 µg/l) verwendet. Die Mittelwerte aus fünf separat kalibrierten Analysen, die resultierenden Fehler, die zertifizierten Konzentrationen des Referenzmaterials und die Vergleichsdaten der FGC sind in Tabelle 4.8 für die Analyse des Grundwasserstandards zusammengefasst.

Tabelle 4.8 Vergleich der Validierungsdaten für die Gesamtmittelbestimmung mit der FGC und der FDGC

Element	Konzentration (zertifiziert) [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration FGC [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration FDGC [$\mu\text{g/l}$]
^{27}Al	159 ± 4	$157 \pm 4,3$	$159 \pm 4,2$
^{63}Cu	$45,7 \pm 1,5$	$45,1 \pm 1,8$	$45,6 \pm 1,9$
^{65}Cu	$45,7 \pm 1,5$	$45,0 \pm 1,8$	$45,5 \pm 1,9$
^{75}As	$10,8 \pm 1,4$	$10,7 \pm 1,6$	$10,8 \pm 1,5$
^{111}Cd	$2,94 \pm 0,08$	$2,88 \pm 0,1$	$2,96 \pm 0,12$
^{114}Cd	$2,94 \pm 0,08$	$2,87 \pm 0,1$	$2,96 \pm 0,12$
^{207}Pb	$7,78 \pm 0,13$	$7,75 \pm 0,15$	$7,71 \pm 0,17$
^{208}Pb	$7,78 \pm 0,13$	$7,75 \pm 0,15$	$7,80 \pm 0,17$

Die Messungen des Seronorm II Standards erfolgten wiederum nach vorhergegangener SEC Trennung. Die Kalibration wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Grundwasseranalyse durchgeführt. Als Kalibrationsstandard diente ein Multielementstandard (500 $\mu\text{g/l}$; Co, Ni, As, Cd, Pb, Bi), welcher aus den Einzelementstandards angesetzt wurde. Die Ergebnisse aus fünf separat kalibrierten Analysen sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9 Vergleich der Validierungsdaten für die HPLC mit der FGC und der FDGC

Element	Konzentration (zertifiziert) [$\mu\text{g/l}$]	Unsicherheit [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration FGC [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration FDGC [$\mu\text{g/l}$]
^{59}Co	5,2	4,6 - 5,8	4,3	4,49
^{60}Ni	6,8	5,1 - 8,6	5,5	5,69
^{75}As	11,2	10,5 - 11,8	10,5	10,3
^{111}Cd	5,4	4,8 - 6,0	4,7	4,3
^{114}Cd	5,4	4,8 - 6,0	4,6	4,3
^{207}Pb	395	337 - 417	363	365
^{208}Pb	395	337 - 417	362	365
^{209}Bi	5,1	4,6 - 5,5	4,1	4,2

4.5.5 Proteinquantifizierung

Vor den zweidimensionalen Analysen wurde die Gesamtproteinkonzentration der Plasmaprobe mit Hilfe der Methode von Bradford ^[59] bestimmt. Hierzu wurde 100 µl Plasma mit 200 µl einer sauren Coomassie G-250 Lösung versetzt. Anschließend wurde die Probe mit Citratpuffer (40 mmol/l pH=7,4) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurde die Probe im Photometer vermessen. Die Auswertung erfolgte, bezogen auf eine BSA-Kalibrationsreihe, mittels der vom Hersteller des Photometers mitgelieferten Software. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf das Volumen der Probe normiert. Durch eine Dreifachbestimmung konnte so ein Gesamtproteingehalt von $59,8 \pm 0,5$ mg/ml ermittelt werden. Aufgrund der Abhängigkeit der Trap-Effektivität vom isoelektrischen Punkt des Analyten (siehe Kapitel 4.4.5) wurde nun für diese Probe die Wiederfindungsrate bestimmt.

Hierzu wurde die empirisch ermittelte Maximalkonzentration von 6 mg Protein (150 µl 2:1 verdünntes Plasma), welche sowohl eine Überladung der SEC Trennsäule als auch eine Überschreitung des maximal zulässigen Arbeitsdrucks von 15 bar vermeidet, aufgetragen. Die Fraktionen der zweiten Trenndimension (IEX/HIC siehe Kapitel 4.6) wurden mit Hilfe des Fraktionssammlers aliquotiert. Anschließend konnte die Gesamtproteinkonzentration der Aliquote mit der Methode von Bradford bestimmt werden. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen variierte zwischen 80 µg und 420 µg Protein. Insgesamt konnten 4,05 mg Protein nach der zweiten Trenndimension nachgewiesen werden. Hieraus ergibt sich eine Wiederfindungsrate von 67 ± 1 %, welche durch eine Dreifachbestimmung ermittelt wurde.

4.6 2D-HPLC an Blutplasma

Für die zweidimensionalen HPLC-Untersuchungen wurden beide UV/Vis-Detektoren der HPLC verwendet. Hierbei wurden die UV-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen. In der ICP-MS wurden analog zu den UV-Daten die essentiellen Spurenelemente ^{52}Cr , $^{54/56/57}\text{Fe}$, ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{65}Cu , $^{66/68}\text{Zn}$, ^{96}Mo , $^{118/120}\text{Sn}$, und $^{24/25}\text{Mg}$ im Helium-Modus detektiert, sowie die Heteroelemente Phosphor und Schwefel, welche im Sauerstoff-Modus analysiert wurden. Des weiteren wurde eine interne Standardisierung durch die kontinuierliche Zugabe von 10 µg/l der Elemente $^{69/71}\text{Ga}$, ^{115}In und ^{205}Tl durchgeführt. Die Aquisitionszeit betrug 0,1 s je Isotop. Um die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können wurden die Analysen dreifach wiederholt. Die höchste Intensität der UV-Signale der Size-Exclusion Trennung (Abbildung 4.29 vertikal) wurde bei der Fraktion mit einem Molekulargewicht von 60-100 kDa im Plasma detektiert. Dieser Größenbereich stimmt mit dem Molekulargewichten von Albumin (68 kDa) ^[52] und Transferin (72 kDa) ^[71] überein. Die Höhe der Signalintensität korreliert mit dem prozentualen Anteil der Komponenten im Blutplasma ^[50,52]. Das UV-Chromatogramm zeigt, dass Proteine, deren Molekulargewichte nur geringe Unterschiede aufweisen, mit der Size-Exclusion Chromatographie nur unzureichend voneinander getrennt werden können.

Ein Beispiel hierfür ist die Albumin/Transferrin-Fraktion (RT= 50 min). Mit Hilfe der Multielement-Detektion der ICP-MS ist es dennoch möglich, verschiedene Metallproteine innerhalb dieser Fraktionen zu unterscheiden. Die ICP-MS Signale von Nickel und Kupfer, die im Helium Modus detektiert wurden, liegen beim Vergleich mit dem UV-Chromatogramm beide innerhalb der Albumin/Transferin Fraktion (RT= 50 min) (Abbildung 4.28).

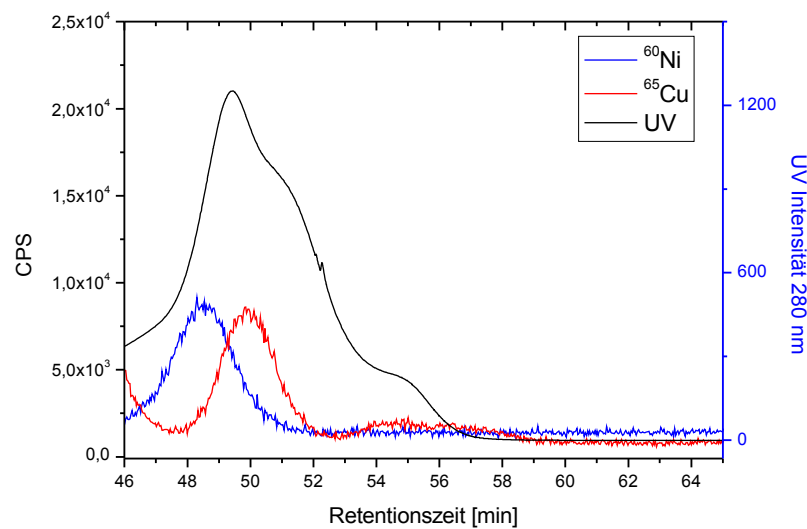


Abbildung 4.28 Ausschnitt der UV (-) und ICP-MS Chromatogramme der Albumin Fraktion von Nickel (-) und Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe **Abbildung 4.9**

Aufgrund einer geringfügigen Differenz in der Retentionszeit der Metallsignale kann davon ausgegangen werden, dass hier mindestens zwei unterschiedliche Metall-Protein Assoziationen vorliegen. Da die Trennleistung einer eindimensionalen Separation für derartige Problemstellungen nicht ausreichend ist, wurde ein zweidimensionales Trennverfahren (Kapitel 2.1) angewendet.

Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.4 wurde sowohl die HIC als auch die IEX als zweite Separationsmethode nach der Size-Exclusion Chromatographie eingesetzt. **Abbildung 4.29** zeigt den direkten Vergleich beider Trenntechniken anhand einer zweidimensionalen Trennung von Blutplasma. Das vertikal dargestellte Chromatogramm beschreibt die SEC-Trennung.

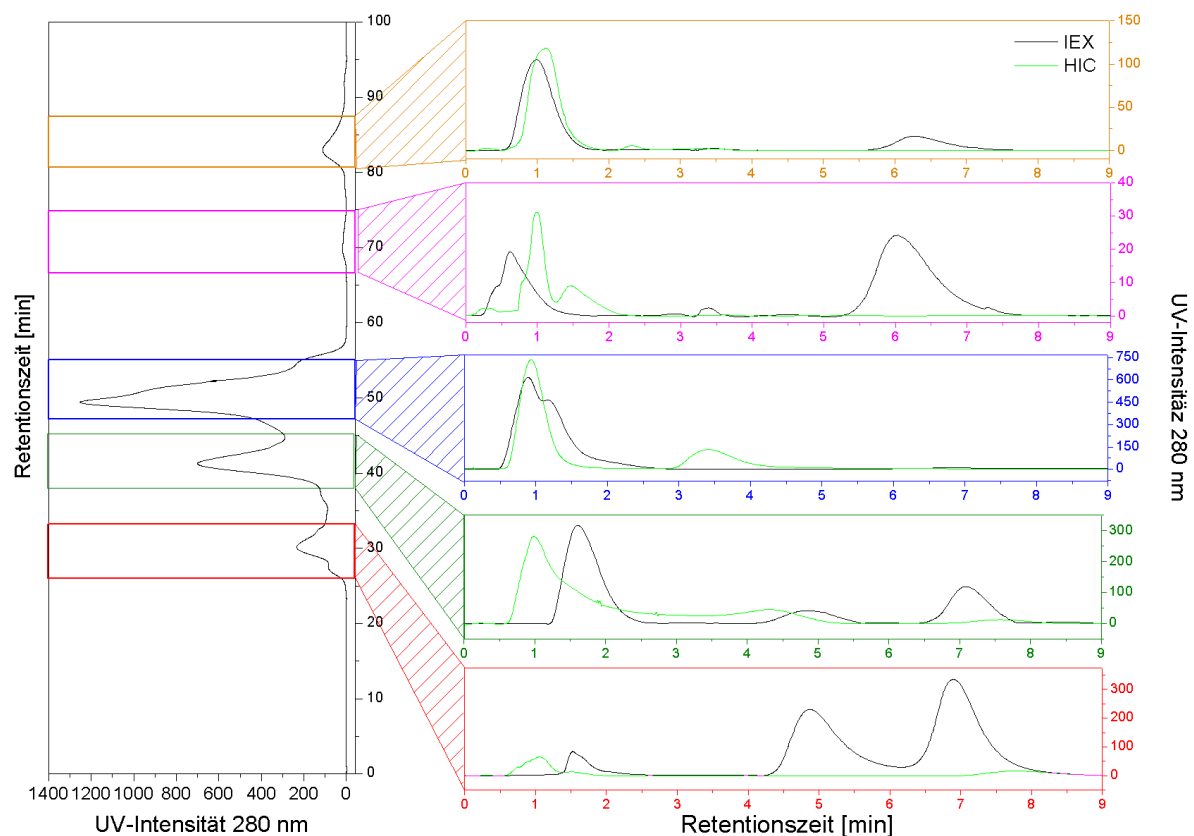


Abbildung 4.29 2D-HPLC Separation von Blutplasma; Links erste Dimension SEC von Plasma ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9; Rechts Vergleich IEX und HIC Separation in der zweiten Dimension chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 3.4.4 & 3.4.5

Mit Hilfe der Kalibrationsdaten für die SEC (Kapitel 4.4.1.1) wurden den Fraktionen Molekulargewichtsbereiche zugeordnet: rot ≥ 400 kDa, grün 110-250 kDa, blau 60-100 kDa, magenta 30-50 kDa und orange 10-20 kDa. In den horizontal angeordneten Chromatogrammen sind die HIC (grün) und die IEX (schwarz) Chromatogramme der jeweiligen Fraktionen abgebildet. Der direkte Vergleich beider Trennmethode zeigt eine deutliche Überlegenheit der IEX-Separation für die ≥ 400 kDa, 110-250 kDa, 30-50 kDa und 10-20 kDa Fraktion. Bei der Auftrennung des 60-100 kDa Ausschnittes produziert die IEX einen Peak mit Schulter, was auf mindestens zwei unvollständig voneinander separierte Spezies hinweist. Im Gegensatz hierzu erzeugt die HIC zwei Basislinien getrennte Signale.

Zur Optimierung der Trennleistung in der zweiten Dimension wurde daher eine Kombination beider Techniken angestrebt. Die Eluenten der HIC und der IEX Separation sind identisch und unterscheiden sich nur durch den Verlauf der

verwendeten Gradienten (siehe Kapitel 3.4.4 & 3.4.5). Die Startbedingungen des HIC Gradienten (100 % Tris/HCl, 40mmol, pH = 7,4; mit 0,6 mol/l NH₄Ac) entsprechen den Bedingungen der IEX am Ende einer Trennung und die Endkonzentration des HIC Gradienten (0 % Tris/HCl, 40mmol, pH = 7,4; mit 0,6 mol/l NH₄Ac) sind identisch mit dem Gradientenstart der IEX. Die Trennungen sind somit kompatibel und können ohne vorherige Äquilibration des HPLC-Systems nacheinander in einem Chromatographielauf eingesetzt werden. Hierzu wurde das Säulenschaltventil (vgl. Abbildung 4.8 Seite 60), welches ein automatisiertes Wechseln der Trennsäule ermöglicht, verwendet. Alle nachfolgenden Analysen wurden in der zweiten Dimension mit dieser kombinierten Technik vermessen, wobei die ≥ 400 kDa, 110-250 kDa, 30-50 kDa und die 10-20 kDa Fraktion mit der IEX und die 60-100 kDa Fraktion mit der HIC aufgetrennt wurden. Das resultierende UV Chromatogramm ist in Abbildung 4.30 dargestellt.

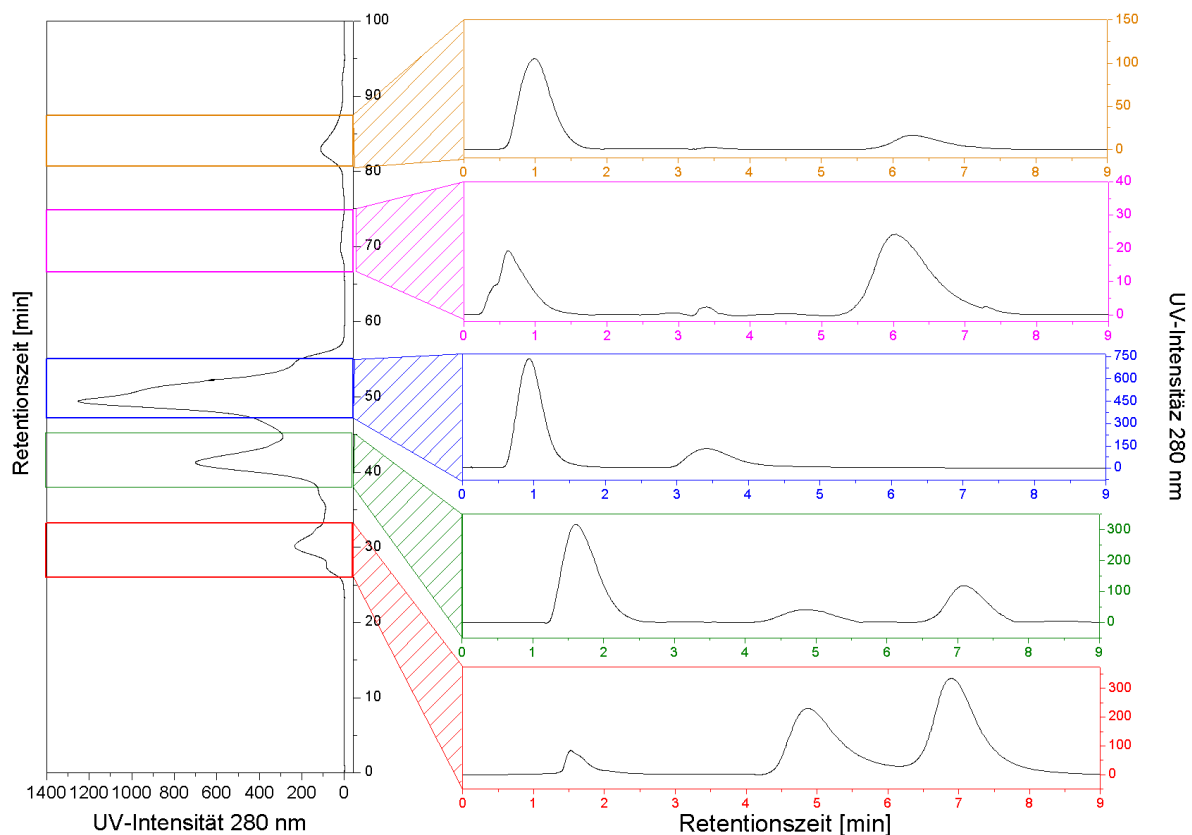


Abbildung 4.30 2D-HPLC Separation von Blutplasma; Links erste Dimension SEC von Plasma ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9; Rechts IEX und HIC Separation in der zweiten Dimension chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.6

Aufgrund der verbesserten Trennleistung ist es nun möglich die zuvor eindimensional detektierten, aber nicht vollständig separierten Kupfer und Nickel Spezies der 60-100 kDa Fraktion voneinander zu trennen. In Abbildung 4.31 ist das UV-Chromatogramm und das ICP-MS Signal von Nickel dieser Fraktion dargestellt. Hierbei ist eine Korrelation des Nickelsignals mit dem ersten UV-Signal zu beobachten. Aufgrund der Signalintensität und der Größenfraktion liegt der Schluss nahe, dass es sich hierbei um die Albuminfraktion handelt, welche ein Molekulargewicht von 68 kDa und eine relative Häufigkeit von 50-70 % ^[50] besitzt.

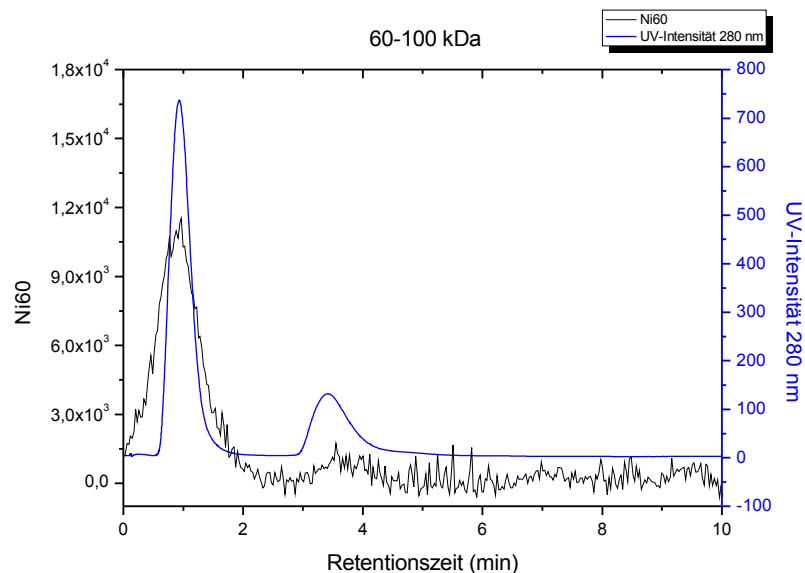


Abbildung 4.31 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

In Gegensatz hierzu zeigt der Vergleich zwischen dem Kupfersignal und dem UV-Chromatogramm eine Übereinstimmung mit dem zweiten UV-Peak (Abbildung 4.32).

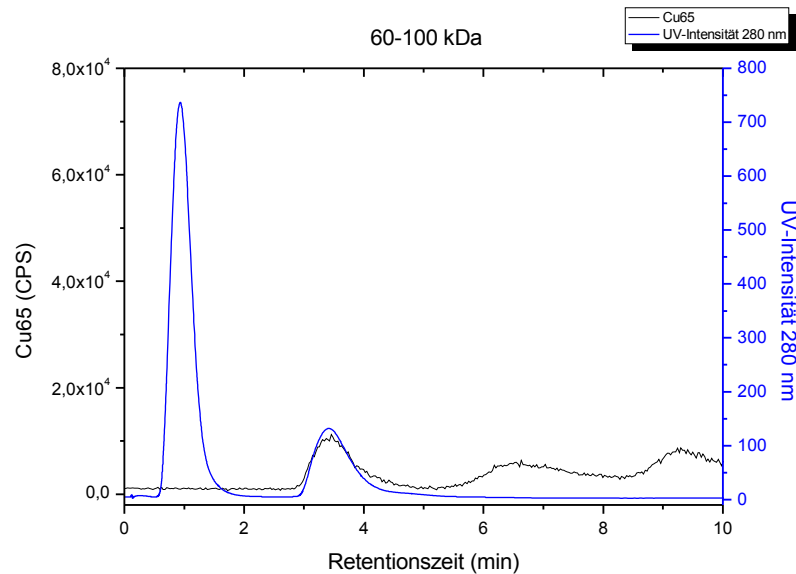


Abbildung 4.32 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Des weiteren konnten zwei weitere Kupfersignale detektiert werden (RT = 6,3 min & RT = 9,2 min). Diese korrelieren nicht mit den UV-Signalen, was durch die wesentlich höhere Nachweisstärke der ICP-MS im Vergleich zum UV-Detektor begründet werden kann, da die UV-Absorption von niederabundanten Proteinen oft nicht ausreichend ist um ein messbares UV-Signal zu erzeugen.

Neben den Elementen Kupfer und Nickel konnte bei der 60-100 kDa Fraktion eine Korrelation des ersten UV-Signals der HIC-Separation (RT=1,2 min) mit dem Zink-Signal der ICP-MS beobachtet werden (Abbildung 4.33)

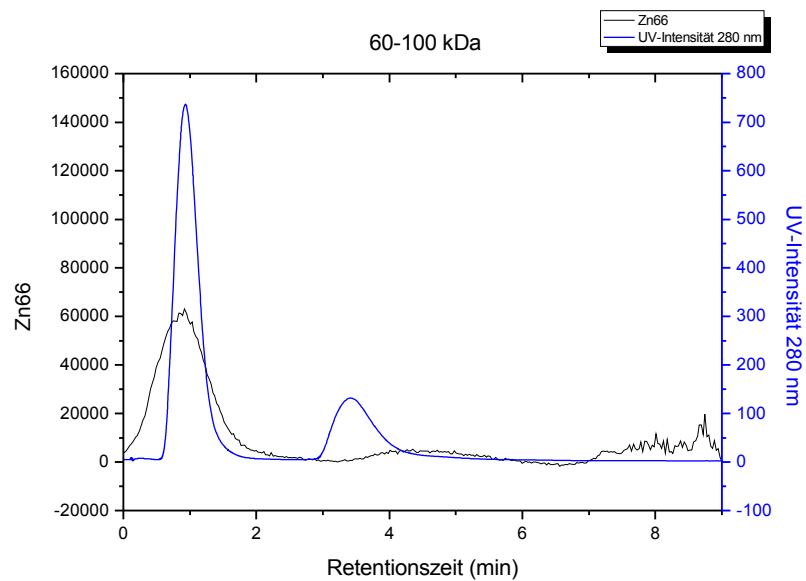


Abbildung 4.33 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Zink (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Die Analyse von Schwefel zeigte eine gute Übereinstimmung des Signals mit dem ersten UV-Peak (Abbildung 4.34).

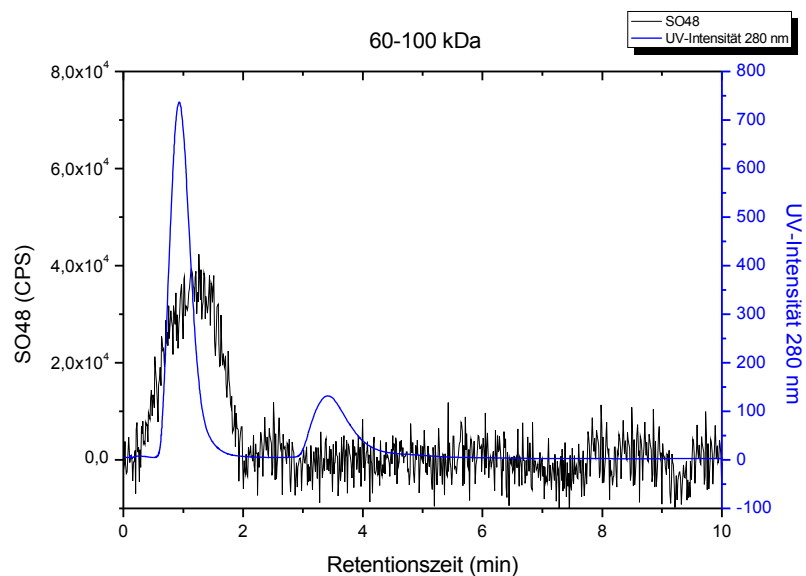


Abbildung 4.34 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Im Gegensatz hierzu konnten nach der zweiten Trenndimension in dieser Größenfraktion kein Phosphor detektiert werden.

4.6.1 Die 10-20 kDa Fraktion

Der Vergleich des Magnesiumsignals der ICP-MS und des UV-Chromatogramms, welches mit einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wurde, zeigt einen übereinstimmenden Peak nach einer Retentionszeit von 1,2 Minuten (Abbildung 4.35). Des weiteren ist eine Korrelation mit dem zweiten UV-Signal (RT = 3,6 min) zu beobachten. Das Magnesium Signal erstreckt sich hierbei überwiegend auf Bereiche, welche außerhalb des UV-Signals liegen. Aufgrund der wesentlich höheren Nachweisstärke der ICP-MS im Vergleich zum UV-Detektor liegt der Schluss nahe, dass der UV-Detektor vorhandene niederabundante Metall-Protein Assoziationen nicht erfasst.

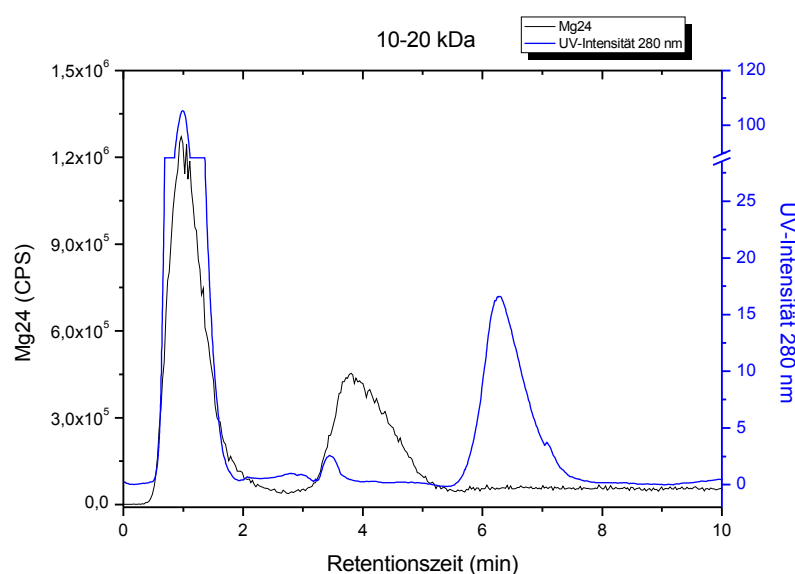


Abbildung 4.35 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Magnesium (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Die Auswertung des UV-Chromatograms und der Eisen Signale der ICP-MS zeigte bei zwei Signalen in der 10-20 kDa Fraktion Übereinstimmungen. Neben einer Korrelation der Signale bei einer Retentionszeit von 1,2 Minuten konnte eine weitere Assoziation nach einer Retentionszeit von 6,4 Minuten detektiert werden (Abbildung 4.36).

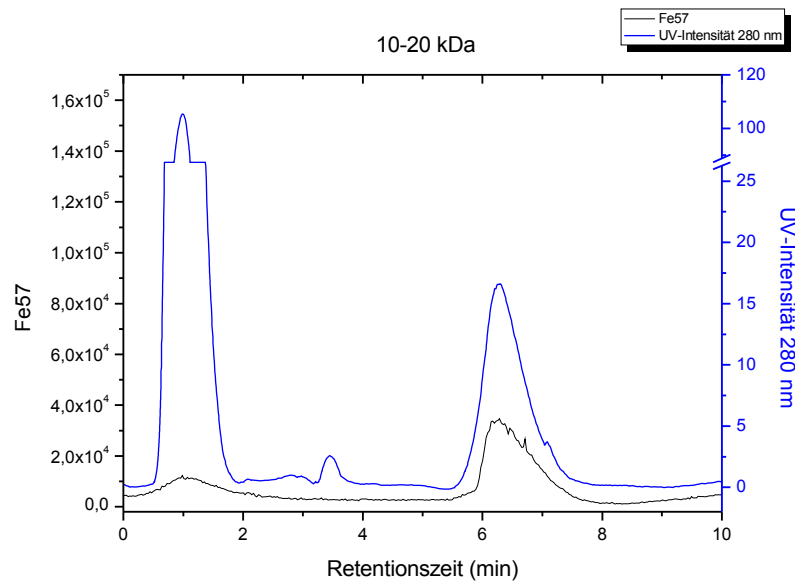


Abbildung 4.36 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Eisen (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Das Molekulargewicht von ca. 10 kDa ist typisch für verschiedene eisenhaltige Cytochrome wie zum Beispiel Cytochrom-C (12 kDa)^[45].

Ein weiteres Element, dessen ICP-MS Signal in dieser Größenfraktion detektiert werden konnte, ist Nickel. Hierbei wurden drei Peaks aufgenommen (RT=1,2 min, 4,2 min und 6,9 min). Zwei der drei Signale korrelieren gut mit dem UV-Chromatogramm der zweiten Trenndimension (RT=1,2 min und 6,9 min).

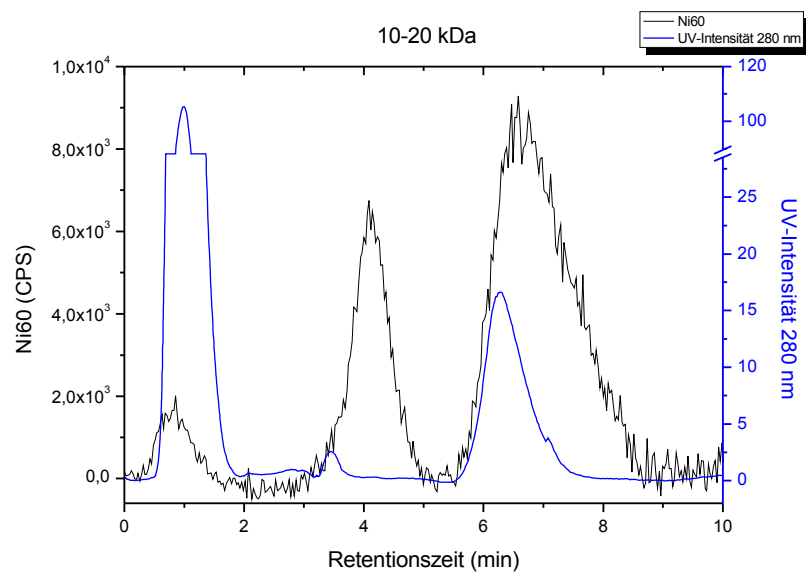


Abbildung 4.37 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Der dritte Elementsignal, welches zur gleichen Retentionszeit wie das Magnesiumsignal auftritt, überschneidet sich nur teilweise mit dem UV-Signal (Abbildung 4.37).

In dieser Größenfraktion konnte ebenfalls Kupfer nachgewiesen werden. Die ICP-MS Signale korrelieren zum einen mit dem ersten UV-Signal (RT=1,2 min) als auch mit dem dritten UV-Peak (RT=6,4 min) (Abbildung 4.38). Neben diesen eindeutig zuzuordnenden Kupfersignalen ist ein breiter Intensitätsanstieg im Bereich von 3,2-5,5 Minuten zu beobachten, welcher keinem UV-Signal zugeordnet werden kann.

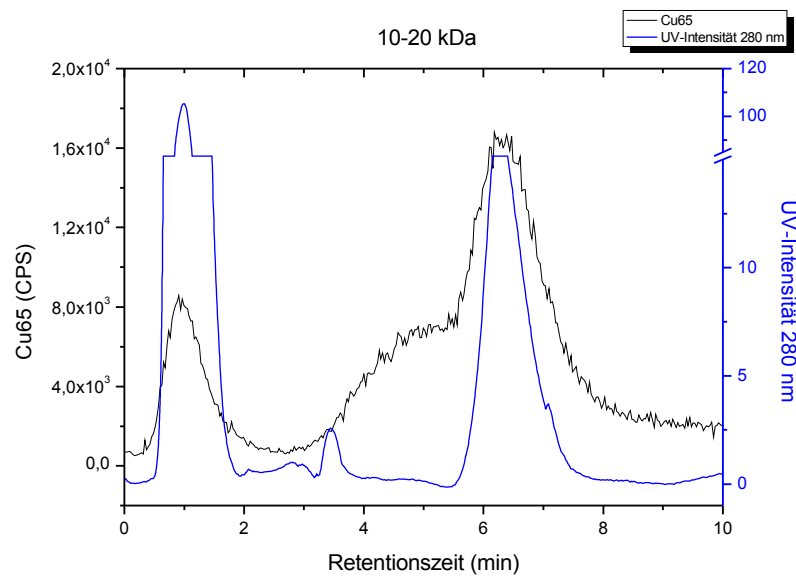


Abbildung 4.38 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Der Vergleich des Zinksignals mit den UV-Daten zeigt gute Übereinstimmungen der ersten zwei UV-Signale mit der Elementspur ($RT = 0,8$ min, $RT = 3,4$ min) der ICP-MS (Abbildung 4.39). Des weiteren konnte eine Korrelation des dritten Zinksignals mit einer Schulter ($RT = 7,2$ min) des dritten UV-Peaks beobachtet werden.

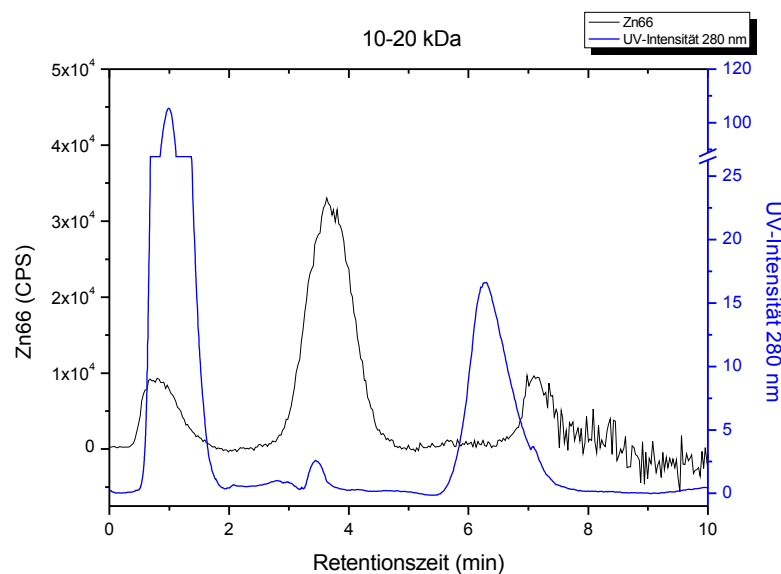


Abbildung 4.39 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Zink (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Aufgrund der Korrelation der Zinksignale ($RT = 0,8$ min, $RT = 3,4$ min) mit den Schwefelsignalen ($RT = 0,9$ min, $RT = 3,6$ min), welche im Sauerstoffmodus detektiert werden konnten (Abbildung 4.40) kann davon ausgegangen werden, dass das Zink mit hoher Wahrscheinlichkeit an Metallthionine ^[69,70] assoziiert ist.

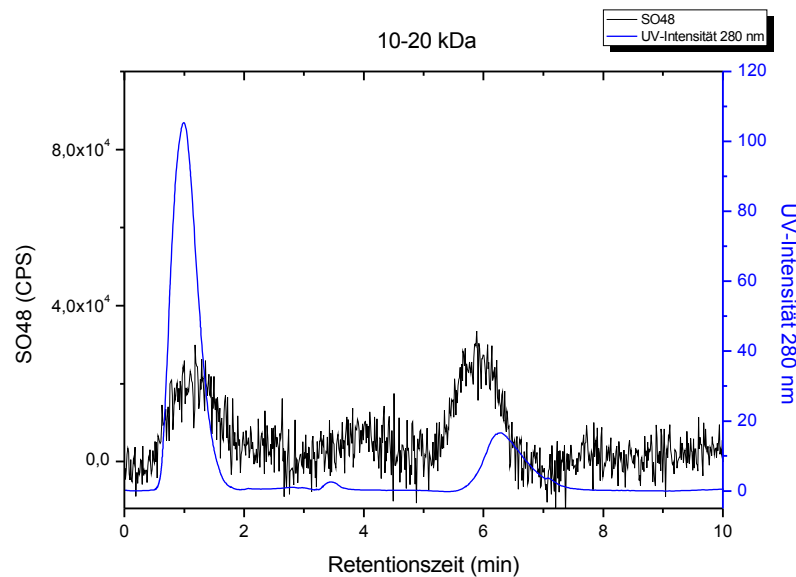


Abbildung 4.40 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Die Analyse des Phosphors, welcher ebenfalls im Sauerstoffmodus (Kapitel 2.9 & 4.1) als ^{47}PO gemessen wurde, und der Vergleich mit den UV-Chromatogramm der 10-20 kDa Fraktion, welche bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wurde, zeigt die Anwesenheit von phosphorylierten Proteinspezies ($RT = 6,4$) in dieser Größenfraktion (Abbildung 4.41).

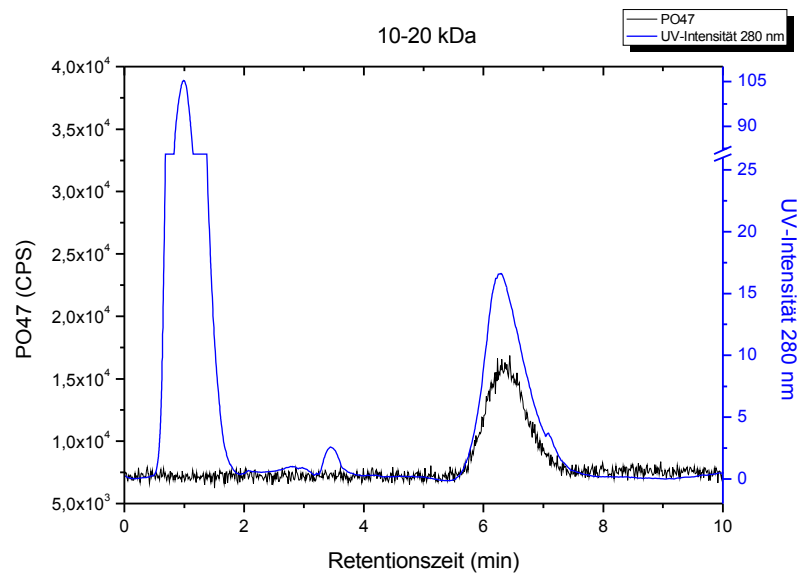


Abbildung 4.41 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

4.6.2 Die 30-50 kDa Fraktion

In der 30-50 kDa Fraktion wurde in der ICP-MS kein Metallsignal detektiert. Die Analyse der Elementdaten vom Schwefel zeigt für den Schwefel eine eindeutige Korrelation des Signals mit dem dritten UV-Signal (RT=6,2 min) (Abbildung 4.42).

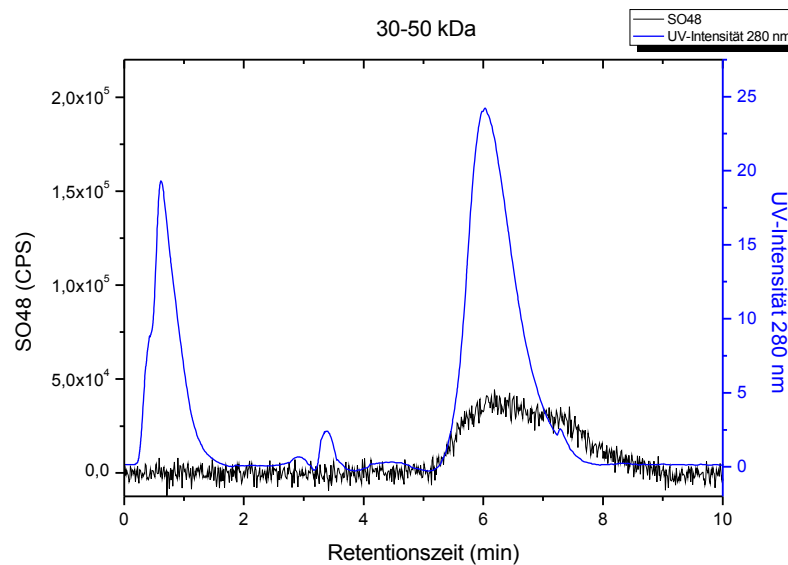


Abbildung 4.42 UV-Chromatogramm 30-50 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

4.6.3 Die 110-250 kDa Fraktion

Der Vergleich der UV-Daten der zweiten Trenndimension, welche bei der Analyse der 110-250 kDa Fraktion gewonnen wurden, mit dem ICP-MS Signal des Elementes Kupfer, zeigt zum einen ein Elementsignal ($RT=2,9$ min), welches keine Korrelation mit dem UV-Signal aufweist (Abbildung 4.43). Des weiteren ist eine gute Übereinstimmung zwischen dem zweiten Kupfersignal und einem UV-Peak mit einer Retentionszeit von 7,2 Minuten zu beobachten. Aufgrund der Größenfraktion, aus welcher diese Proteinspezies stammt und den Quantifizierungsdaten (Tabelle 4.12) handelt es sich bei dieser Spezies mit hoher Wahrscheinlichkeit um Ceruloplasmin (137 kDa). Ceruloplasmin ist aus der Literatur ^[52,53] als Kupfertransporter bekannt und enthält ca. 70% des gesamten Kupfervorkommens des humanen Blutplasmas.

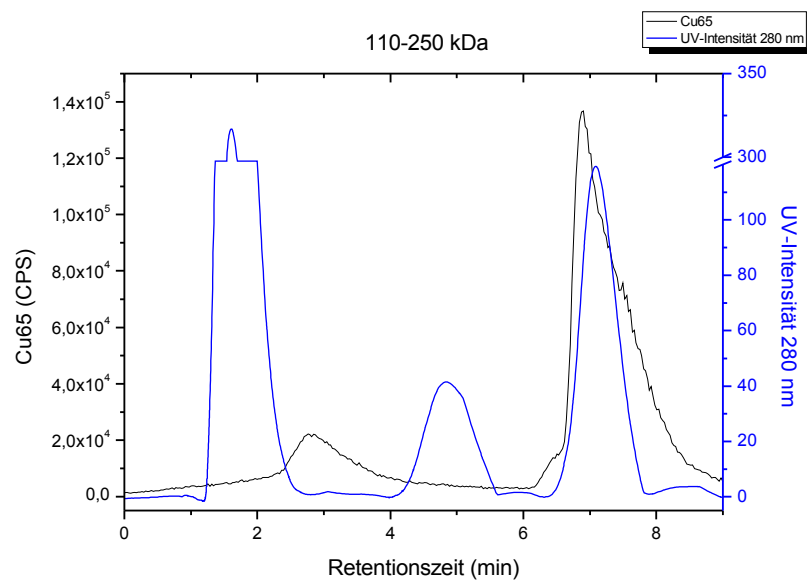


Abbildung 4.43 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Neben Kupfer wurden zwei Phosphorsignale in dieser Proteinfraction detektiert. Das erste Proteinsignal, welches mit dem UV-Detektor aufgenommen wurde (RT= 1,9 min) korreliert hierbei mit einem Phosphorsignal (Abbildung 4.44).

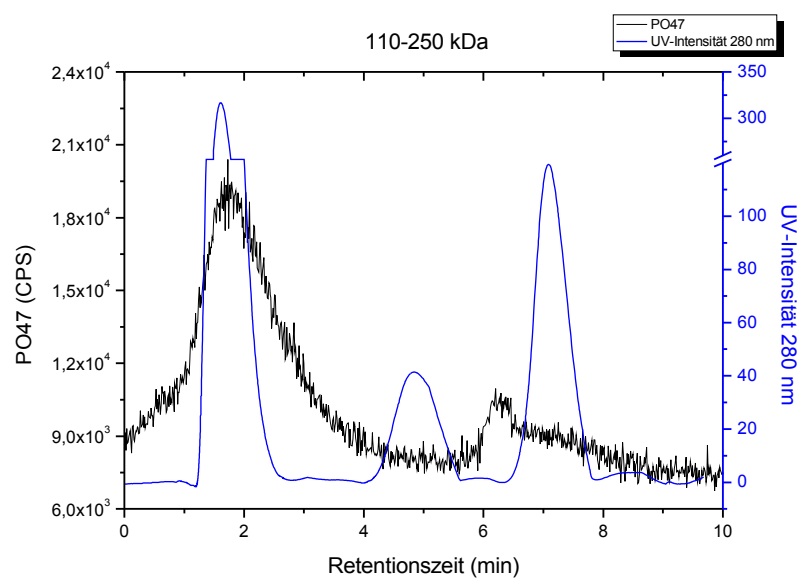


Abbildung 4.44 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Das zweite Elementsignal (RT= 6,3 min) überlappt nur teilweise mit einem UV-Signal (RT=7,2 min), wobei das Maximum des Elementsignals außerhalb des UV-Peaks zu finden ist. Dieses Signal wird wahrscheinlich durch niederabundante phosphorierte Proteine hervorgerufen, welche durch den UV-Detektor nicht mehr erfasst werden können. Des weiteren wurden Übereinstimmungen des Elementsignals von Schwefel und dem UV-Chromatogramm beobachtet (Abbildung 4.45).

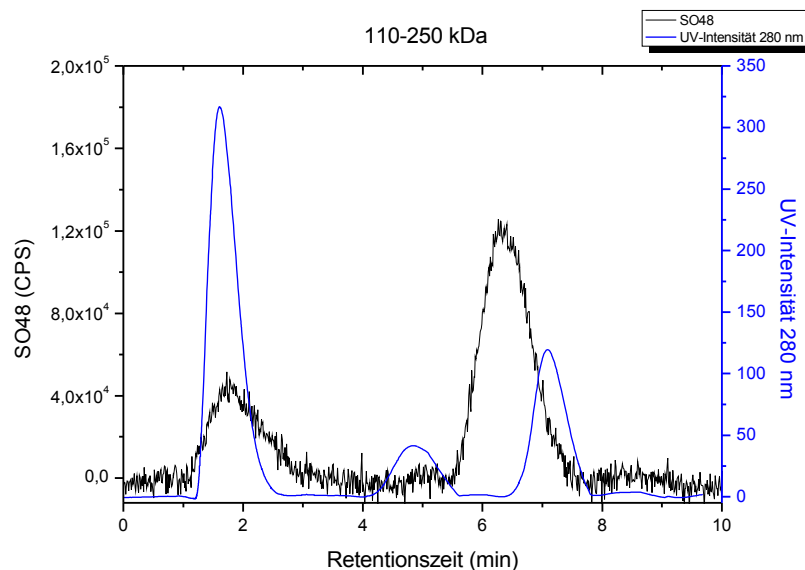


Abbildung 4.45 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Der erste UV-Peak (RT=1,9 min) korreliert hierbei mit dem ersten Schwefelpeak. Des weiteren zeigt der Vergleich der Daten eine Überlappung des Schwefelsignals (RT=6,5 min) mit dem UV-Signal mit einer Retentionszeit von 7,2 Minuten. Hierbei sind die Maxima beider Signale gegeneinander verschoben, was auf die Anwesenheit von Proteinen mit geringer UV-Aktivität oder in sehr geringer Konzentration, welche nicht vom UV-Detektor erfasst werden, schließen lässt.

4.6.4 Die 400-600 kDa Fraktion

Die Auswertung der Elementinformationen, welche mit Hilfe der induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometrie gewonnen wurden, und des UV-Chromatogramms der 400-600 kDa Fraktion, welches nach dem zweiten Separationsschritt bei 280 nm aufgenommen wurde, erlaubt ebenfalls Aussagen über detektierte Metall-Protein Assoziationen. Hierbei korreliert beispielsweise das Eisensignal der ICP-MS mit dem zweiten UV-Signal (Abbildung 4.46)

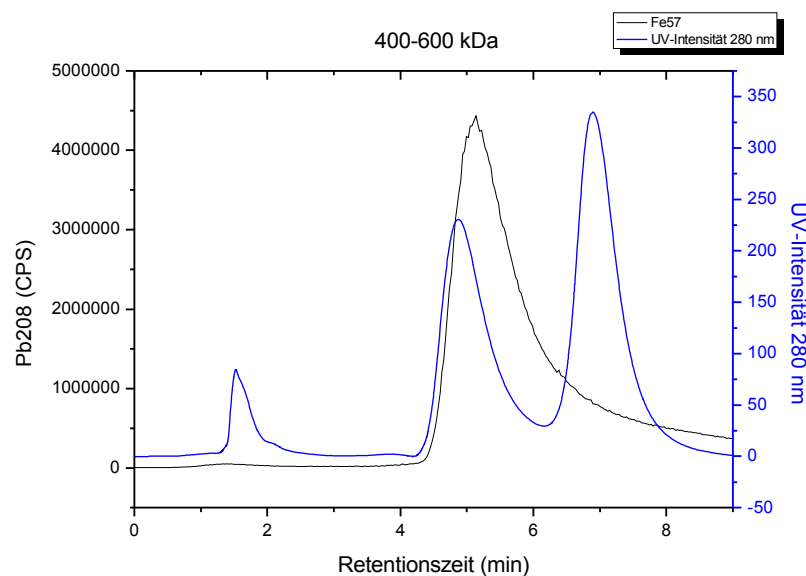


Abbildung 4.46 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Eisen (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Aufgrund der Größenfraktion aus welcher diese Proteinspezies stammt, handelt es sich bei dieser Spezies mit hoher Wahrscheinlichkeit um Ferritin (440 kDa) ^[50,52,53].

Eine weitere Metall-Protein Assoziation wurde durch den Vergleich des Nickelsignals mit den UV-Daten nachgewiesen (Abbildung 4.47). Hierbei ist eine Korrelation beider Signale bei einer Retentionszeit von 1,6 Minuten zu beobachten.

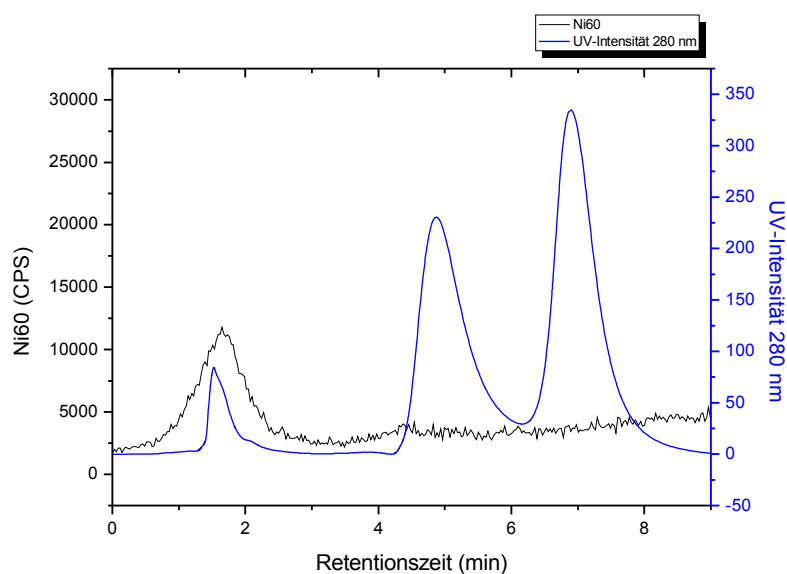


Abbildung 4.47 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Des weiteren konnte eine gute Übereinstimmung zwischen dem ersten UV-Peak (RT= 1,6 min) und dem Elementsignal von Zinn (Abbildung 4.48) beobachtet werden, welches eine geringe Signalintensität (vgl. Tabelle 4.12) aufweist.

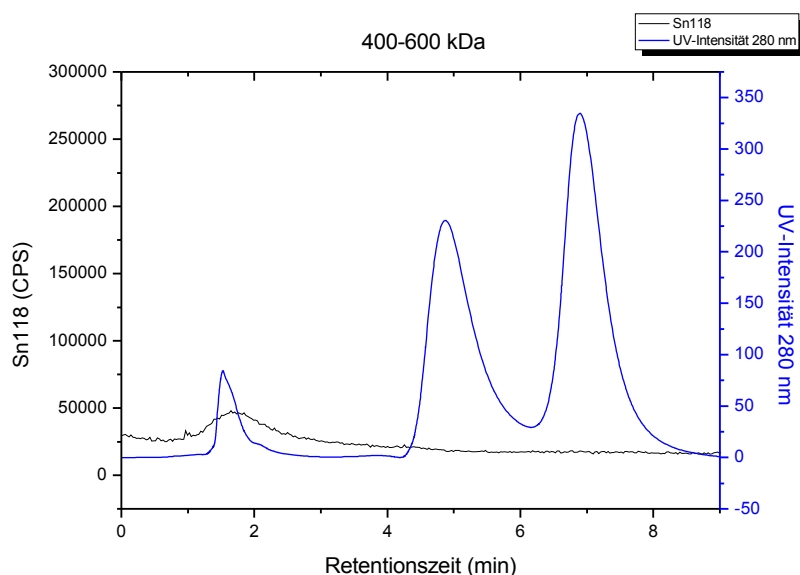


Abbildung 4.48 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Zinn (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Die Auswertung der Phosphorspur der ICP-MS zeigt ein deutliches Signal bei einer Retentionszeit von 6,9 Minuten, welches mit dem UV-Signal (RT=7,0 min) nahezu übereinstimmt (Abbildung 4.49).

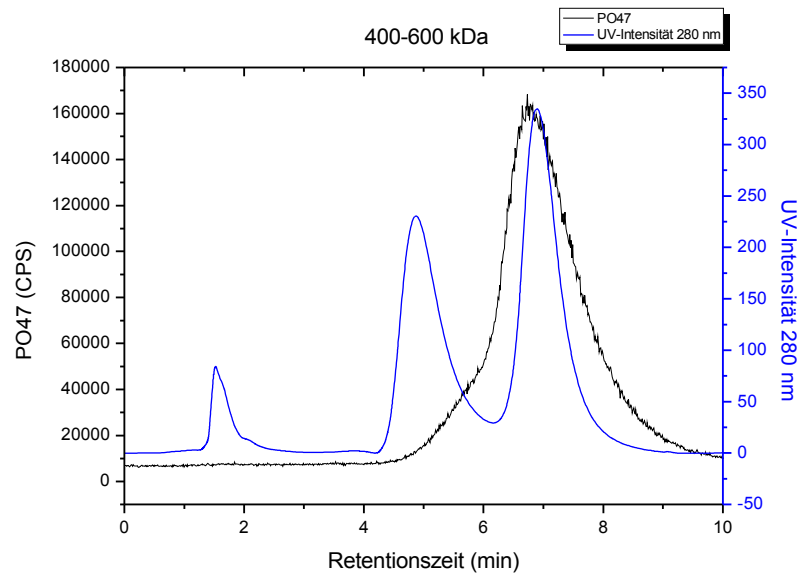


Abbildung 4.49 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Die Elementdaten von Schwefel, welche mittels ICP-MS aufgenommen wurden, korrelieren vollständig mit dem zweiten und dritten UV-Peak. Das erste Schwefelsignal, welches sowohl das erste UV-Signal als auch den Bereich zwischen den ersten und zweiten UV-Peak (Abbildung 4.50) überlagert, deutet auf die Anwesenheit von niederabundanten Proteinen in diesem Bereich hin.

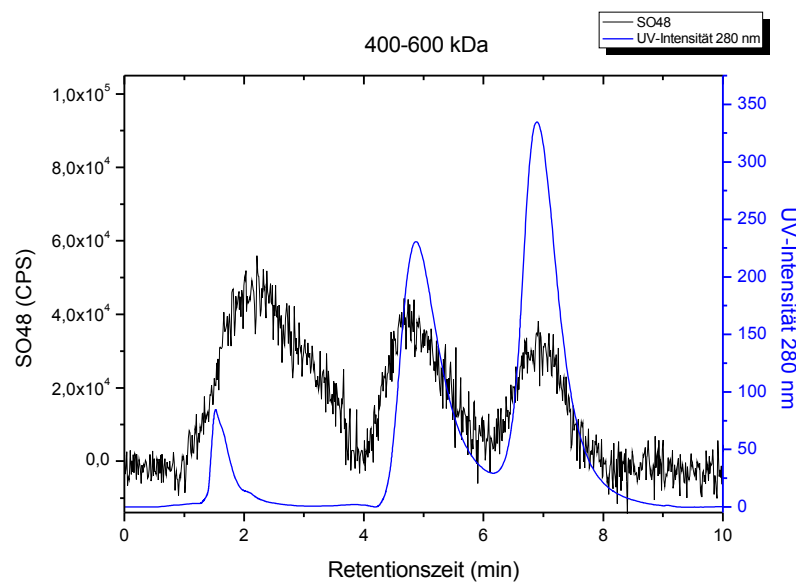


Abbildung 4.50 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30

Tabelle 4.12 (Seite 114) zeigt eine Übersicht aller detektierten Metall-Protein Assoziationen, deren Molekulargewichtsbereich und der jeweilig assoziierten Elemente.

4.7 Metallquantifizierung

Die Quantifizierung der Metalle in der Plasmaprobe erfolgte mit Hilfe der Fast Gradient Calibration Technik. Hierbei wurde der Eluentenstrom nach dem ersten Separationsschritt, welcher mit einer ICP-MS ohne Kollisions-/Reaktionszelle (Agilent 7500 a) gekoppelt wurde und der Ausgang der zweiten Trenndimension parallel vermessen. Aufgrund des anspruchsvolleren Puffersystems der zweiten Trennstufe wurde hierbei eine ICP-MS mit Kollisionszelle (Agilent 7500 ce) eingesetzt (vgl. Abbildung 4.8 Seite 60). Für die Analysen wurden sowohl die Trennung mit der kombinierten SEC-IEX/HIC Methode, wie sie in Kapitel 4.6 beschrieben ist, als auch die reinen SEC-IEX beziehungsweise SEC-HIC Techniken verwendet. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe eines Mikrowellendruckaufschlusses überprüft, was die Ermittlung von Wiederfindungsraten und die Abschätzung von Aufarbeitungsverlusten bei der Probenvorbereitung ermöglicht. Die Qualität des Mikrowellendruckaufschlusses wurde

zusätzlich mit Hilfe eines Seronorm II Blutstandards überwacht. Alle Analysen wurden dreifach ausgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Die Abweichungen der experimentell bestimmten Mengen aller detektierten Elemente und die im Seronorm Standard zertifizierten Konzentrationen wichen um maximal 5% voneinander ab. In Tabelle 4.10 sind die Daten, welche nach der ersten Trenndimension (SEC) und nach dem zweiten Separationsschritt (SEC-IEX, SEC-HIC und SEC-IEX/HIC) ermittelt wurden, sowie deren Unsicherheit aufgeführt.

Tabelle 4.10 Metallquantifizierung ausgewählter Elemente nach der 1. und 2. Trenndimension

Element	SEC		SEC-IEX		SEC-HIC		SEC-IEX/HIC	
	Konzentration [µg/l]	Fehler [µg/l]	Konzentration [µg/l]	Fehler [µg/l]	Konzentration [µg/l]	Fehler [µg/l]	Konzentration [µg/l]	Fehler [µg/l]
²⁴ Mg	1632	15	95,4	1,1	94,2	1,0	96,0	1,0
⁵⁴ Fe	14,21	1,8	89,2	2,1	89,87	2,0	89,52	1,9
⁵⁷ Fe	14,83	2,1	88,8	1,9	90,11	2,0	88,72	1,8
⁵⁹ Co	n.n	-	n.n	-	n.n	-	n.n	-
⁶⁰ Ni	52,3	1,4	37,9	1,4	37,3	1,4	37,04	1,2
⁶⁵ Cu	79,9	1,3	63,7	1,5	64,9	1,5	65,7	1,6
⁶⁶ Zn	65,2	4	53,13	3,8	52,97	3,8	53,41	3,7
⁶⁸ Zn	65,1	4	52,7	3,9	52,51	3,7	53,01	3,9
⁷⁵ As	n.n	-	n.n	-	n.n	-	n.n	-
¹¹⁸ Sn	n.n	-	7,18	0,2	7,38	0,19	7,33	0,2
¹²⁰ Sn	n.n	-	7,01	0,18	7,25	0,19	7,23	0,2
²⁰⁹ Bi	n.n	-	n.n	-	n.n	-	n.n	-

Um die Wiederfindungsraten für die Metalle nach chromatographischer Trennung zu bestimmen, wurde die Summe der Konzentrationen, welche nach dem ersten und zweiten Separationsschritt ermittelt wurden, herangezogen und mit den Analyseergebnissen der Gesamtmetallbestimmung verglichen. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um die Beeinflussung der Wiederfindungsraten durch die Varianz der Effektivität des Trap-Systems auszuschließen, welche vom isoelektrischen Punkt des jeweiligen Analyten abhängt (Kapitel 4.4.5). Hierdurch wird eine Beurteilung von chromatographisch bedingten Effekten, wie zum Beispiel die Anreicherung von Metallspezies auf den Trennsäulen, ermöglicht. In Tabelle 4.11 sind die

Mittelwerte der Gesamtmetalbestimmung von jeweils drei Analysen sowie deren Unsicherheit zusammengefasst. Aufgrund der geringen Abweichung der Elementkonzentrationen zwischen den unterschiedlichen Trennsystemen der zweiten Dimension, welche innerhalb der Standardabweichung liegen (Tabelle 4.10), wurden der Mittelwert der jeweiligen Elementkonzentration zur Bestimmung der Wiederfindungsraten herangezogen (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11 Wiederfindungsraten (Zusammenfassung)

Element	Gesamtmetalbestimmung		Summe 1.& 2.D HPLC	
	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Fehler [$\mu\text{g/l}$]	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindung [%]
^{24}Mg	1862,00	12	1727	93
^{54}Fe	162,38	4	103,74	64
^{57}Fe	164,56	4	104,04	63
^{60}Ni	93,29	2	89,71	96
^{65}Cu	198,1	3	144,67	72
^{66}Zn	135,37	6	118,37	87
^{68}Zn	136,47	6	117,84	86
^{118}Sn	9,48	0,2	7,29	76
^{120}Sn	9,52	0,22	7,16	75

Eine Übersicht aller detektierten Metall-Protein Assoziationen und die Quantifizierungsdaten der einzelnen Signale sind in Tabelle 4.12 (Seite 114) zusammengefasst.

4.8 Proteinidentifizierung

Neben den Elementinformationen und deren Quantifizierung ist die Identifikation der Metall-Protein Assoziation nach chromatographischer Trennung für den Einsatz dieser zweidimensionalen HPLC-Separationstechnik im Bereich der Metabolismusstudien von entscheidender Bedeutung. Die Analysen des organischen Anteils der detektierten Metall-Protein Assoziation erfolgte mit Hilfe der in der Proteinanalytik gut etablierten MALDI-Technik. Hierzu wurden die Proteinfractionen, welche nach der zweiten Trenndimension der HPLC gesammelt wurden, mit Probenpuffer versetzt. Anschließend konnten jeweils 5 µl der Proben mit einer SDS-PAGE (Kapitel 3.2.4.1) aufgereinigt und entsalzt werden. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 4.51).

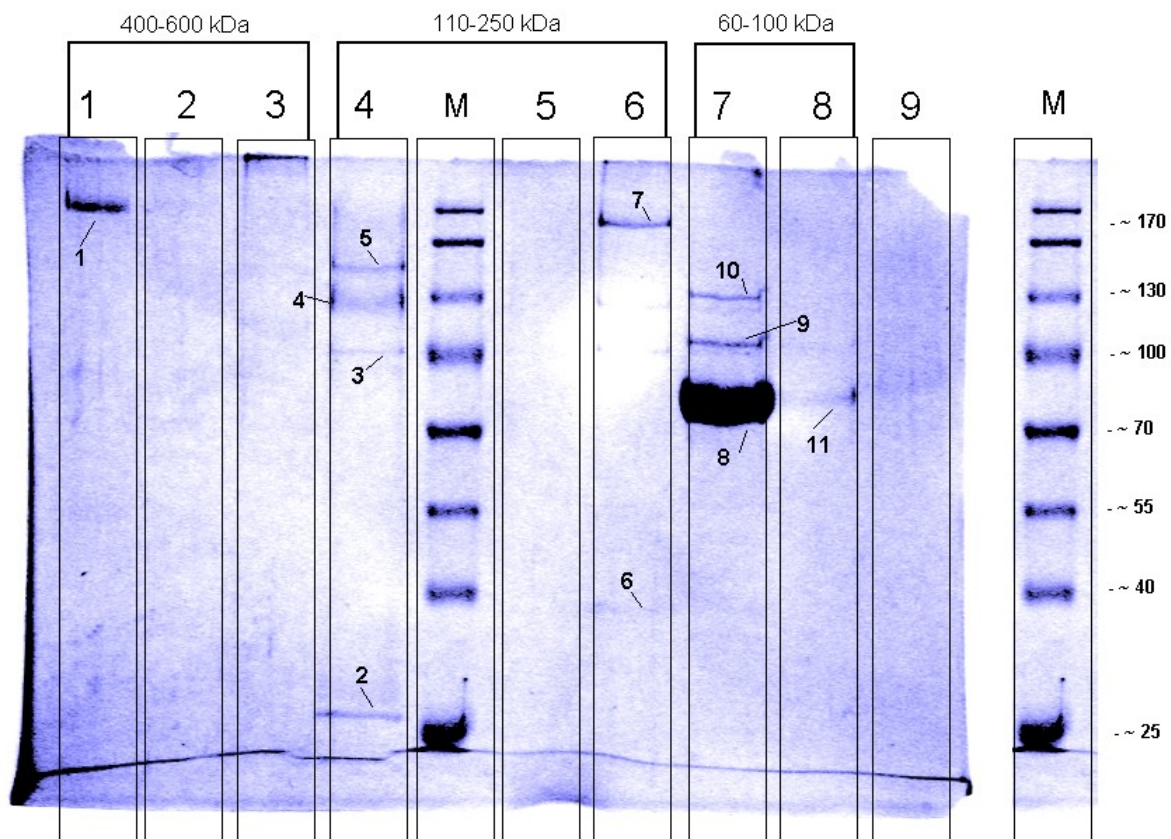


Abbildung 4.51 SDS-Gel (10%) für die MALDI Analytik

In den Taschen 1 bis 3 befinden sich die Proben der 400-600 kDa Fraktion, darauf folgen die Peaks der 110-250 kDa Fraktion (4-6) und die der 60-100 kDa Fraktion (7 & 8) (vgl. Abbildung 4.30 Seite 92). In die Tasche, welche mit M gekennzeichnet ist wurde ein Proteinmarker, welcher als Größenstandard für die Gelelektrophorese fungiert, aufgebracht. Die Proteinfraktionen aus dem 30-50 kDa und 10-20 kDa Bereich, welche auf ein zweites Gel aufgetragen wurden, konnten aufgrund der geringen Konzentration (vgl. Signalintensität Abbildung 4.30 Seite 92) mit der Coomassie-Färbung nicht sichtbar gemacht werden. Durch die Verwendung einer empfindlicheren Färbetechnik oder durch eine erhöhte Probenmenge kann eine Analyse dieser Fraktionen ermöglicht werden. Die separierten und entsalzten Proteinproben (1-11) wurden mit einem Skalpell aus dem Gel gelöst und separat in Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend erfolgte die Probenvorbereitung für die MALDI Analyse, welche in Kapitel 3.3.2 beschrieben ist. Die Auswertung der Spektren erlaubte die Identifizierung von zwei Proteinen der 60-100 kDa Fraktion (Probe 8 & 11 auf dem Gel), welche bereits mit der 2D-HPLC voneinander separiert werden konnten. Der Molekülpeak aus Probe 8 wurde mit einem m/z von 67790,60 bestimmt. Des weiteren wurde ein Dimer mit einem m/z von 135580,37 und das doppelt geladene Protein ($m/z=33895,63$) detektiert (Abbildung 4.52).

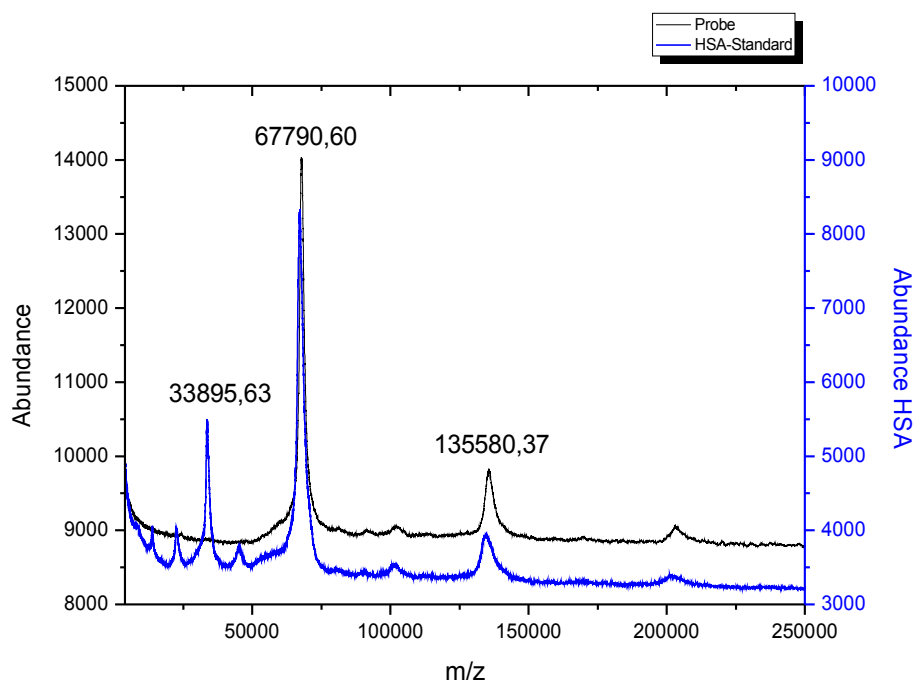


Abbildung 4.52 MALDI-Spektrum HSA-Standard (-) und HSA (-) aus Blutplasma

Der Vergleich des MALDI-Spektrums mit dem Spektrum eines HSA-Standards (Abbildung 4.52) zeigte eine gute Übereinstimmung. Hierdurch konnte das Protein aus Probe 8 eindeutig als humanes Serum Albumin identifiziert werden.

Die Analyse von Probe 11 hingegen zeigte ein M^+ Signal mit einem m/z von 72823,8. Des weiteren konnten das M^{2+} Signal mit $m/z = 36411,75$ und das Dimer mit einer Masse von 145646,94 detektiert werden (Abbildung 4.53).

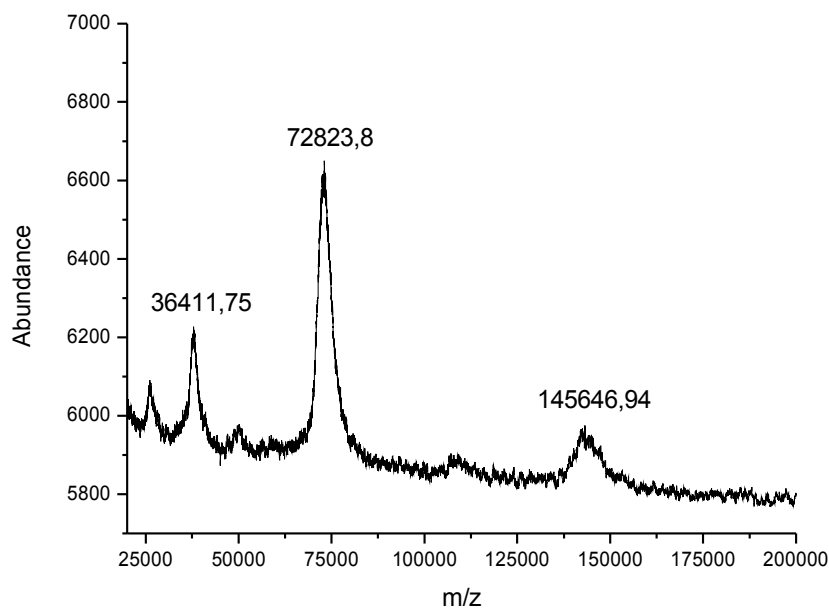


Abbildung 4.53 MALDI-Spektrum Transferrin (-) aus Blutplasma

Der Vergleich dieser Daten mit dem Molekulargewichten einiger Serumproteine, welche aus der Literatur ^[71-73] bekannt sind, zeigte eine sehr gute Korrelation mit humanen Transferrin (MW = 72823). Die Untersuchungen der Proben 1 bis 7 sowie der Proben 9 und 10, lieferten keine eindeutigen Daten, welche eine Identifikation des jeweiligen Proteins ermöglichen. Ein enzymatischer oder chemischer Verdau dieser Proben würde höchstwahrscheinlich charakteristischere MALDI-Spektren erzeugen, wodurch die Speziation dieser Analyten mit Hilfe von Proteindatenbanken ermöglicht wird. In Tabelle 4.12 sind die qualitativen und quantitativen Elementinformationen, die Ergebnisse der auf Literaturdaten basierenden Identifikation der Proteine (Kapitel 4.6) und der Speziation, welche mit der MALDI-TOF-MS durchgeführt wurde, zusammengefasst.

Tabelle 4.12 Detektierte Metall-Protein Assoziationen in Humanblutplasma

Element	Fraktion [kDa]	RT 2D [min]	Metallgehalt [$\mu\text{g/l}$]	Identifizierung (lit oder MALDI)
^{24}Mg	10-20	1,2	61,05	
^{24}Mg	10-20	3,9	34,95	
$^{54/56/57}\text{Fe}$	10-20	1,2	2,31	Cytochrome (lit)
$^{54/56/57}\text{Fe}$	10-20	8,4	6,82	Cytochrome (lit)
$^{54/56/57}\text{Fe}$	400-600	5,2	80,59	Ferritin (lit)
^{65}Cu	10-20	1,2	2,37	Metallthionin (lit)
^{65}Cu	10-20	6,4	10,64	Metallthionin (lit)
^{65}Cu	60-100	3,4	3,61	Transferrin (MALDI)
^{65}Cu	110-250	2,9	8,93	
^{65}Cu	110-250	7,2	40,15	Ceruloplasmin (lit)
^{60}Ni	10-20	1,2	0,85	Metallthionin (lit)
^{60}Ni	10-20	4,2	9,19	Metallthionin (lit)
^{60}Ni	10-20	6,9	11,63	Metallthionin (lit)
^{60}Ni	60-100	1,2	4,04	Albumin (MALDI)
^{60}Ni	400-600	1,6	11,33	
$^{66/68}\text{Zn}$	10-20	0,8	6,17	Metallthionin (lit)
$^{66/68}\text{Zn}$	10-20	3,4	14,10	Metallthionin (lit)
$^{66/68}\text{Zn}$	10-20	7,2	7,02	Metallthionin (lit)
$^{66/68}\text{Zn}$	60-100	1,1	26,12	Albumin (MALDI)
$^{118/120}\text{Sn}$	400-600	1,6	7,2	

Einige der detektierten Metall-Protein Assoziation konnten mit den eingesetzten Methoden nicht identifiziert werden. Die Nickel und Zinn Spezies, welche in der 400-600 kDa Fraktion gefunden wurden, unterscheiden sich in der Retentionszeit ($RT = 1,6$ min) in der zweiten Trenndimension deutlich von dem hier ebenfalls detektierten Ferritin ($RT = 5,2$ min), daher kann die Assoziation von Nickel und Zinn an Ferritin als Ursache für die beobachteten Signale nahezu ausgeschlossen werden. Eine Assoziation dieser Elemente an Proteine aus der IgM Gruppe, welche ebenfalls in dieser Größenfraktion vorliegen ist daher wahrscheinlicher. Das nicht identifizierte Kupfersignal in der 100-250 kDa Fraktion ($RT = 2,9$ min) könnte durch Ceruloplasmin, welches in dieser Größenfraktion mit einer

Retentionszeit von 7,2 Minuten detektiert wurde hervorgerufen werden, welches nicht vollständig mit Kupfer beladen ist und somit einen Ladungsunterschied im Vergleich mit der abgesättigten Form aufweisen könnte, was zu einer Verschiebung in der Retentionszeit führt. Eine weitere Möglichkeit hierbei ist eine Kupferassoziation an Macroglobin (170 kDa) oder IgG Proteine (~150 kDa), welche ebenfalls in dieser Proteinfraction vorliegen.

4.9 HPLC-GE-Kopplung

Im Rahmen des analytischen Gesamtkonzeptes (vgl. Kapitel 1.1) wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing.Chem. J.Toffel die Möglichkeit einer online-Kopplung der HPLC und der in der Proteinanalytik gut etablierten Technik der Polyacrylamid Gelelektrophorese untersucht. Die Erweiterung der zweidimensionalen flüssigkeitschromatographischen Separation um einen nativen elektrophoretischen Trennschritt soll hierbei die Trennleistung nochmals steigern, was die Gewinnung von Molekülinformationen vereinfachen würde.

4.9.1 HPLC-GE Interface

Für die Realisierung einer online-Kopplung von HPLC-Systemen mit der Gelelektrophorese wurde ein Interface (Abbildung 4.54) benötigt, welches sowohl den Proben transfer als auch die notwendigen Anpassungen des HPLC-Eluenten automatisiert durchführen kann. Für die Probenaufgabe auf das Gel wurde der Fraktionssammler (Gilson Liquid Handler 221 XL) des HPLC-Systems umprogrammiert, wodurch die Injektion der vorgetrennten Proteine direkt in eine Tasche des Gels ermöglicht wird. Des weiteren ist zur Einhaltung der für die Gelelektrophorese erforderlichen Parameter die Anpassung des HPLC-Eluenten nach erfolgter Proteintrennung erforderlich. Mit Hilfe eines T-Stückes und einer Dosierpumpe, welche zwischen dem UV-DAD Detektor und dem Fraktionssammler in den

Flußweg der zweiten Dimension integriert wurde, kann das Laufmittel der HPLC durch den Zusatz eines geeigneten Pufferkonzentrats angepasst werden.

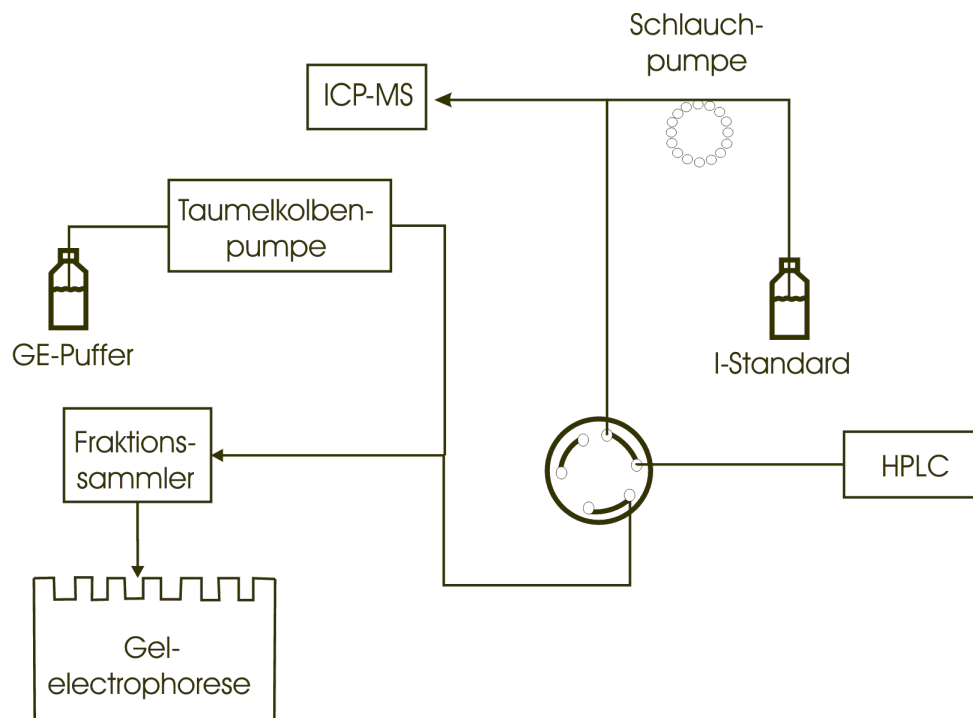


Abbildung 4.54 Aufbau HPLC-GE Interface

Aufgrund der geringen Fehlertoleranz, welche bei der Positionierung der Injektionsnadel des Fraktionssammlers über der jeweiligen Geltasche vorhanden ist, wurden die Taschen bei den ersten Versuchen nicht immer getroffen und bei Kollisionen der Nadel mit den Glasplatten, zwischen welchen sich das Gel befand, traten Deformationen der Injektionsnadel auf. Dieses Problem wurde durch den Einsatz einer Einführhilfe (Abbildung 4.55) gelöst, welche geringe Abweichungen der Nadel von der angestrebten Position gegebenenfalls korrigiert.



Abbildung 4.55 Einführhilfe HPLC-GE

Aufgrund der langen Trennzeit der 2D-HPLC (100 min) und der daraus resultierenden Standzeit der Proben vor Beginn der eigentlichen Elektrophorese konnten Diffusionsprobleme beobachtet werden. Um der Diffusion entgegenwirken zu können, wurde eine Spannung von 6 Volt an die Elektrophoresekammer angelegt. Hierdurch wird eine Vorzugsrichtung vorgegeben, so dass die Proteine in den jeweiligen Taschen gehalten werden. Die Spannung reicht aber nicht aus, um eine vorzeitige Wanderung der Proteine im Gel auszulösen.

4.9.2 Test der enzymatischen Aktivität

Für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen ist die Erhaltung ihrer Tertiär- und Quartärstruktur während der gesamten Trennung von entscheidender Bedeutung. Daher werden für die Analytik Trennverfahren benötigt, welche eine native Separation der Proteine und somit den Erhalt der Proteinstrukturen gewährleisten. Die entwickelte multidimensionale HPLC Analytik wurde hierauf mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase (AP) untersucht. Die verwendete Alkalische Phosphatase (Fluka, Buchs, Schweiz), welche aus der Magenschleimhaut von Kälbern gewonnen wurde, ist ein Metallprotein. Die Metalle (Zink und Magnesium) sind hierbei sowohl für die Ausbildung der Tertiärstruktur als auch für die katalytischen Prozesse des Proteins unverzichtbar. Für die Untersuchungen wurden 3 mg AP in 100 µl Citratpuffer (pH=7,4; 40 mmol/l) in das HPLC System injiziert und mittels SEC-IEX Separation aufgereinigt. Hierdurch konnten drei Fraktionen erzeugt werden, aus welchen jeweils 30 µl mit Hilfe des HPLC-GE Interfaces auf ein natives Polyacrylamid Gel aufgebracht wurden (Kapitel 3.2.4.2). Der Eluent der zweiten Trenndimension wurde durch die Zudosierung eines Pufferkonzentrates, bestehend aus 20,00 ml Wasser, 16,25 ml Tris/HCl Puffer (pH=6,8; 0,5 mol/l) und 13,75 ml Glycerol den Erfordernissen der Gelelektrophorese angepasst; der zusätzliche Fluß betrug 0,15 ml/min. Die nachfolgende Gelelektrophorese und der Test der enzymatischen Aktivität wurde an unserem Institut von Dipl.Ing.Chem. J.Toffel durchgeführt. Zum einen zeigen die Ergebnisse dieses Experimentes (Abbildung 4.56), dass mit Hilfe des HPLC-GE-Interface eine ausreichende Proteinmenge auf das Gel transferiert werden kann, zum anderen konnte eine deutliche blaue Färbung auf dem Gel beobachtet werden; hierdurch wurde die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase eindeutig nachgewiesen.

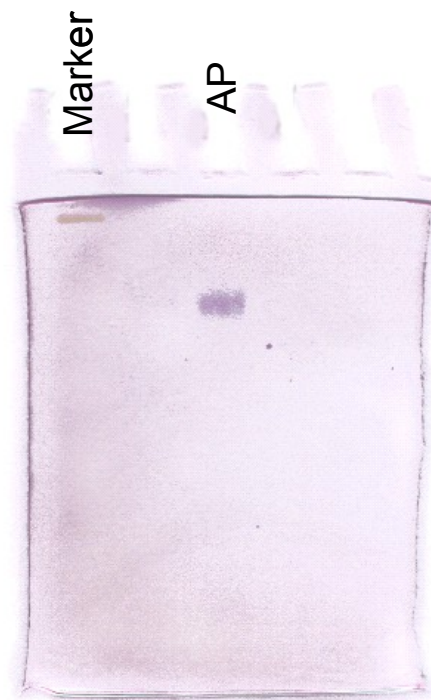


Abbildung 4.56 CN-PAGE von AP nach 3D Separation

5 Diskussion

5.1 Detektoroptimierung

Die induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie ermöglicht eine äußerst nachweisstarke Multielementdetektion. In komplexen biologischen Matrices wird jedoch der Nachweis vieler Elemente durch isobare molekulare Interferenzen limitiert. Diese Limitierungen können zum einen durch die Verwendung von hochauflösenden Massenspektrometern, welche zum Beispiel einem magnetischen Sektorfeld ^[17,18,23,33,36,74] oder einem TOF-Analysator^[17,18,23,33,36] ausgerüstet sind, aufgehoben werden. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von isobare molekulare Interferenzen bei Quadrupol-Geräten bietet die Kollisions-/Reaktionszellentechnologie, welche zunehmend an Bedeutung gewinnt ^[75].

Die Untersuchungen zur Detektionsoptimierung zeigten deutliche Verbesserungen des Signal/Rauschverhältnisses und eine Reduktion von isobaren molekularen Interferenzen bei den Messungen im Kollisions-/Reaktionsmodus. Hierbei ließen sich Argon basierende Interferenzen im Wasserstoffmodus am effektivsten reduzieren (Tabelle 4.2), was sogar die Analyse von stark interferierten Isotopen wie ⁴⁰Ca ermöglichte. Der Heliummodus hingegen ist universeller einsetzbar, da verschiedenste molekulare isobare Interferenzen effektiv verringert werden.

Des weiteren zeigen die Ergebnisse für Elemente wie Blei und Bismut, deren Elementmassen kaum durch Interferenzen gestört werden^[62,75-77], dass hierbei im Vergleich zum Normalmodus kaum Veränderungen des Signal/Rauschverhältnisses zu beobachten sind, da sowohl die Signalintensität als auch das Untergrundrauschen im gleichen Maße reduziert werden. Sowohl der Wasserstoff- als auch der Heliummodus reduzieren artifizielle Signale und ermöglichen somit eine zuverlässige Signalauswertung.

Im Sauerstoffmodus hingegen, in welchem gezielt Oxidionen gebildet werden, verschlechtert sich das Signal/Rauschverhältnis für Elemente wie Eisen (⁵⁶Fe), deren Elementmassen durch Sauerstoff basierende Interferenzen gestört werden

(Tabelle 4.2). Dieser Spezialmodus ist daher nur bedingt für die Multielementdetektion geeignet. Die Stärken des Sauerstoffmodus zeigen sich aber insbesondere bei der Detektion von Heteroelementen wie Phosphor und Schwefel, welche für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen besonders interessant sind, da hierdurch mit Hilfe von Metall/Schwefel oder Metall/Phosphor-Verhältnissen stöchiometrische Informationen verfügbar werden. Die Massen von Phosphor und Schwefel werden massiv durch Sauerstoffinterferenzen gestört, was insbesondere bei der Verwendung von wässrigen Eluenten, wie sie für die native Proteintrennung erforderlich sind, die Detektion erschwert. Durch die Analyse der Oxide dieser Elemente verbessert sich das Signal/Rauschverhältnis (Tabelle 4.2) im Vergleich zum Heliummodus deutlich. Hierbei konnten mit der verwendeten ORC, welche nach Angaben des Herstellers nicht für den Sauerstoffmodus konzipiert ist, vergleichbare Ergebnisse wie sie für die DRC-Technik aus der Literatur bekannt sind ^[75-77] erzielt werden. Insgesamt konnten die Fähigkeiten der ICP-MS als nachweisstarker Multielementdetektor für die Analytik von Humanblut durch den Einsatz der Kollisions/-Reaktionszellentechnologie optimiert, und die ORC-Technologie durch den Einsatz des Sauerstoffmodus um die Möglichkeit der Analyse von Metall/Schwefel oder Metall/Phosphor-Verhältnissen erweitert werden.

5.2 HPLC Optimierung

5.2.1 Size-Exclusion Chromatographie

Für die Size-Exclusion Chromatographie wurde Citratpuffer (pH 7,4 ; 40 mmol/l) als Eluent eingesetzt. Citrat ist ein natürlicher Bestandteil ^[50] des Blutes und wird in der Medizin zur Stabilisierung von Blutkonserven eingesetzt. Aus diesem Grund werden zusätzliche Verunreinigungen der Plasmaproben und das Gerinnen der Probe auf der Chromatographiesäule durch die Verwendung von Citratpuffer minimiert. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Puffersystemen wie zum Beispiel Phosphatpuffer

resultiert aus dem hohen Sauerstoffanteil der Zitronensäure, hierdurch werden die organischen Komponenten der Probe in der Plasmafackel der ICP-MS sauberer verbrannt, was zu geringeren Verunreinigungen durch Kohlenstoffablagerungen in der ICP-MS führt. Vorversuche mit der Size-Exclusion Chromatographie zeigten, dass die Trennleistung unabhängig von der Salzfracht des Eluenten und des Salzgehalts der Probe ist ^[63]. Diese Unabhängigkeit erlaubt es, biologische Proben mit verschiedensten Matrices zu analysieren, ohne die Trennleistung der SEC zu beeinträchtigen. Ein weiterer Vorteil bietet die Möglichkeit der Molekulargewichtsbestimmung, welche mit Hilfe der SEC durchgeführt werden kann. Durch die Kenntnis des Molekulargewichtes oder des Molekulargewichtsbereiches (nach 2D-HPLC) und den ICP-MS Daten können somit Literaturdaten zur Beurteilung der Analyseergebnisse herangezogen werden.

Die eingesetzte SEC-Trennung konnte im Vergleich zu anderen SEC-Separationen von Blutplasma, welche aus der Literatur bekannt sind ^[54,58,75,78], eine verbesserte Trennschärfe erzielen. Dies wird durch den Vergleich der UV-Chromatogramme von Blutplasma aus der Literatur (Abbildung 5.1) deutlich, in welchem drei voneinander separierte Proteinsignale zu erkennen sind, mit dem gemessenen (Abbildung 4.10 Seite 63) UV-Chromatogramm, welches fünf Proteinsignale aufweist.

A. Raab, P. Brätter / J. Chromatogr. B 707 (1998) 17–24

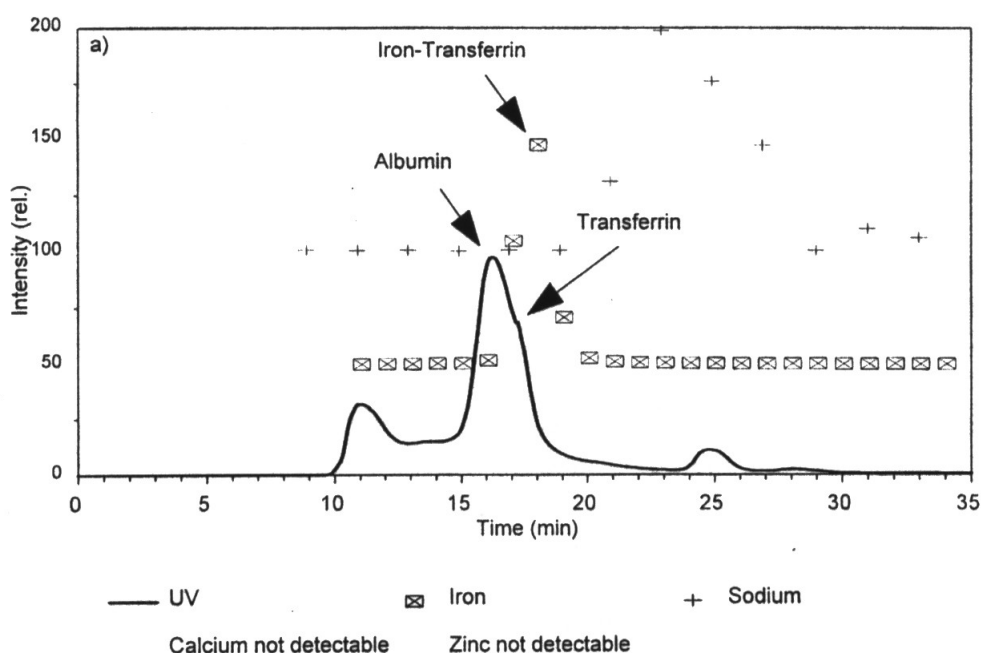


Abbildung 5.1 Trennung von Blutplasma; Fluß: 1.0 ml/min Eluent: Tris (0.1M;pH 7.4), Trennsäule: TSK G 3000 SW [54]

Diese Verbesserung ist hauptsächlich auf die geringere Flußrate von 0,3 ml/min während der Trennung zurückzuführen. Die hieraus resultierende zeitliche Verlängerung eines Chromatographielaufs auf 100 min (vgl. Kapitel 4.6) ermöglicht zusätzlich, eine weitere simultane Separation der Peaks im mehrdimensionalen Betrieb und eröffnet somit die Möglichkeit für eine „echte“ zweidimensionale HPLC-Trennung.

5.2.2 Anionenaustauscher

Die Anionenaustauscherchromatographie ist eine in der Bioanalytik weit verbreitete Separationsmethode ^[17,19,21,61,79,80]. Hierbei werden überwiegend denaturierende Bedingungen ^[79,80] verwendet, da die Trennkapazität dieser Systeme vom pH-Wert des Eluenten und der Ladung des Analyten beeinflusst werden kann (vgl. Kapitel 2.5) und ein leicht basischer pH-Wert deutliche Verbesserungen der Trennleistung zu Folge hat. Die Analysen mit dem Anionenaustauscher (Hamilton PRP-X 100) zeigten, dass alle Proteinspezies in der ersten Fraktion vorlagen und somit keine Retention vorhanden war. Durch die Variation des Salzgradienten und des Eluentenflusses konnten zwei weitere schwache Signale (Abbildung 4.11 Seite 65) beobachtet werden, welche eine Retention aufweisen. Die Anionenaustauscherchromatographie trennt die Proteine aufgrund ihrer Ladung, welche von den jeweiligen isoelektrischen Punkt des Proteins und dem umgebenden pH-Wert abhängig ist. Da eine Variation des pH-Wertes Veränderungen der Tertiärstruktur und somit den Verlust von Metallen oder Artefaktbildung zur Folge hätte, wurden die Optimierungsmöglichkeiten dieser Separationstechnik weitgehend ausgeschöpft. Eine weitere Verringerung der Flußrate oder der Einsatz einer längeren Trennsäule ist aufgrund der hieraus resultierenden zeitlichen Verlängerung eines Chromatographielaufs nicht möglich, da diese längere Separation für den Einsatz im mehrdimensionalen Betrieb ungeeignet ist. Aufgrund der niedrigen Trennleistung wurde daher die AEX-Trennung von Blutplasma für den Einsatz im zweidimensionalen HPLC-System nicht weiterentwickelt. Für die Analyse von Gewebeproben oder bakteriellen Zellextrakten

kann der Einsatz der Anionenaustauscher Chromatographie dennoch sinnvoll sein, da die isoelektrischen Punkte der Analyten anders verteilt sind als im Humanblut. Somit kann es möglich sein, die AEX als zweite Dimension für mehrdimensionale HPLC basierende Untersuchungen von Metallproteinen einzusetzen. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der AEX Analysen der Plasmaproben ergab sich aufgrund der detektierten Metalle. Die Metalle, welche mit dieser chromatographischen Methode über die ICP-MS detektiert wurden und die Metallmengen stimmten mit den Befunden aus der Size-Exclusion Chromatographie sowie der IEX und HIC Separation überein. Diese Übereinstimmungen lassen die Möglichkeit der Probenkontamination durch Verunreinigungen der Chromatographiesäulen unwahrscheinlich erscheinen.

5.2.3 Mischbettionenaustauscher

Die Chromatographie auf Mischbettsäulen, welche sowohl für gaschromatographische ^[26] als auch in der flüssigkeitschromatographische ^[27] Trennungen eingesetzt werden kann, wird aufgrund der komplexen Säulenpräparation und der anspruchsvollen Optimierung (vgl. Kapitel 2.6) nur selten verwendet. Die Mischbettsäulen, welche für den Probentransfer auf die zweite Trenndimension und die nachfolgende Separation verwendet wurden, kombinieren die Eigenschaften der Anionen- und der Kationenaustauscher Chromatographie. Hierdurch kann die Trennleistung beider Separationstechniken ausgenutzt werden, was zu einer deutlichen Verbesserung der Trennleistung, insbesondere bei sehr komplexen Proben ^[26-28], im Vergleich zur reinen Anionenaustauscher Chromatographie führt. Die Untersuchungen der Trapeffektivität zeigten, dass die eingesetzten Mischbettsäulen eine Proteinseparation in Abhängigkeit von den isoelektrischen Punkten der Analyten und dem pH-Wert des Eluenten erzeugt (vgl. Abbildung 4.14 Seite 70). Dies führt dazu, dass die Probentransferrate für jeden Probentyp (Plasmaprobe, Zellextrakte, Gewebeprobe, usw.) neu bestimmt werden muß. Aus der Literatur ^[83,84] ist eine weitere Chromatographietechnik, das Chromatofocusing (CF) bekannt, welche die Analyten

ebenfalls aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte voneinander separiert. Diese Methode basiert auf der Erzeugung eines pH-Gradienten auf einem Anionenaustauscher. Dies geschieht durch den Einsatz von ampholytischen Puffersystemen während der Trennung. Die Proteine verbleiben nach der Probenaufgabe auf der Trennsäule, bis der pH-Wert, welcher ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, in der Laufront erreicht ist und wandert anschließend mit dieser durch die Trennsäule. Im Gegensatz hierzu ermöglicht die Mischbettsäulentechnologie eine ähnliche Separation, welche lediglich durch einen Salzgradienten beeinflusst werden muß. Hierdurch können zum einen konventionelle Puffersysteme, welche für die zweidimensionale Chromatographie deutlich besser geeignet sind, verwendet werden und zum anderen kann diese Technik unter nativen Separationsbedingungen und mit guter Trennleistung (Abbildung 4.13 Seite 68) durchgeführt werden. Da sich die Eigenschaften der Trennsäule aus der Summe der Eigenschaften der Einzelkomponenten (vgl. Kapitel 2.6) zusammensetzt, werden Metallverluste und Artefaktbildungen, welche auf reinen Kationenaustauschern vermehrt beobachtet werden ^[19] können, minimiert. Aufgrund dieser Spezifikationen erlaubt der Einsatz eines Trap-Systems, welches auf Mischbettionenaustauschern basiert, sowohl den Probentransfer von anionischen als auch von kationischen Proteinen. Hierdurch wird im Vergleich zu Systemen, welche nur auf einer Trenntechnik basieren, der Probenverlust durch fehlende Retention auf den Traps deutlich reduziert. Die Untersuchungen der Trapeffektivität lieferte reproduzierbare (Kapitel 4.4.5) und von der jeweils verwendeten Säule unabhängige Wiederfindungsraten der untersuchten Proteine, was auf äquivalent präparierte Säulen schließen lässt. Der Vergleich der elementspezifischen Wiederfindungsraten nach der zweiten Trenndimension (vgl. Tabelle 4.10 Seite 109), welcher in Abbildung 5.2 dargestellt ist, zeigt zum einen, dass die Wiederfindung auf der zweiten Dimension ausschließlich von der Trapeffektivität abhängig ist.

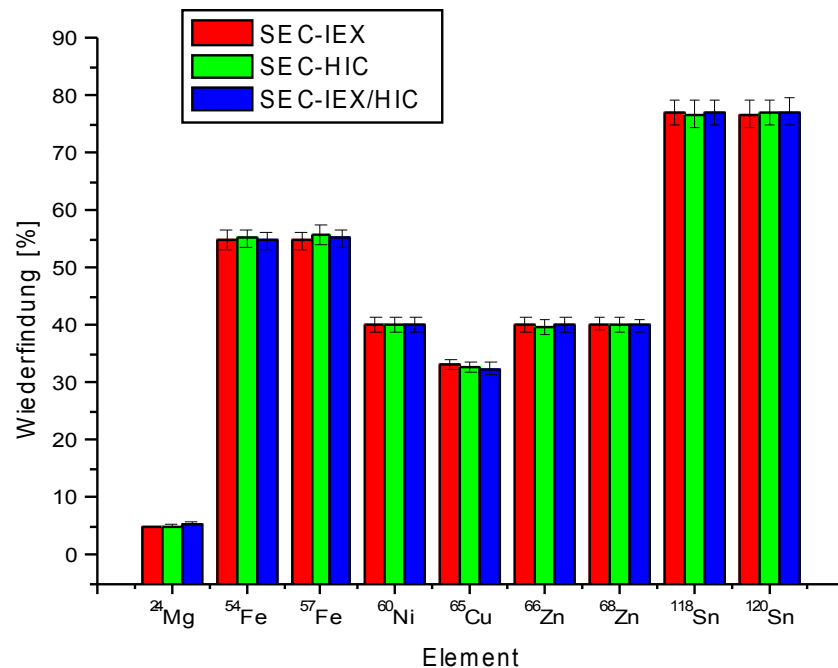


Abbildung 5.2 Vergleich der Wiederfindungsraten nach der 2. Trenndimension

Eine Beeinflussung der Wiederfindung durch die jeweils eingesetzte Separationstechnik kann hierbei nicht beobachtet werden. Des weiteren stellen diese Daten ein weiteres Indiz für einen gut reproduzierbaren und von der jeweils eingesetzten Trap-Säule unabhängigen Trap-Prozess dar.

5.2.4 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie, welche im Gegensatz zu den etablierten Reversed Phase Techniken eine von der Hydrophobizität abhängige Trennung von Proteinen in einem rein wässrigem Medium erlaubt ^[18], konnte erstmals erfolgreich als zweite Trenndimension für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen in humanem Blutplasma etabliert werden. Im Vergleich zu publizierten eindimensionalen Trennungen von humanen Blutplasma ^[24] mit dieser Technik konnte durch die

Optimierung des Flusses und des Gradienten (Kapitel 4.4.3) zum einen eine deutliche Verkürzung der Retentionszeit und eine bessere Trennleistung (vgl. Abbildung 4.12 Seite 66) erzielt werden.

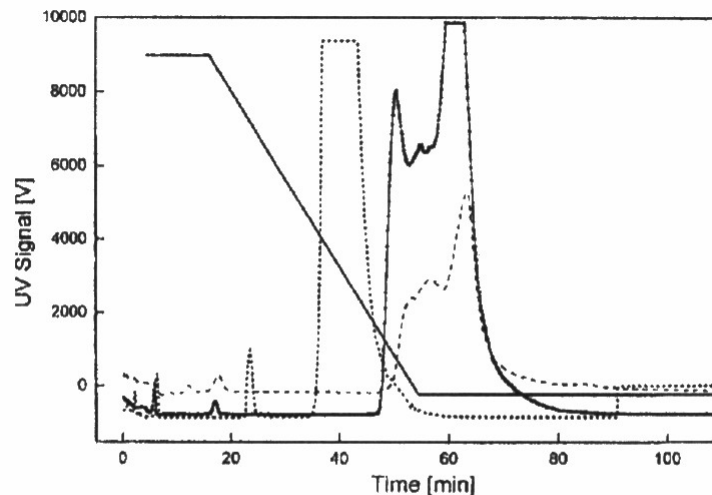


Fig. 2. Chromatograms of blood plasma and of erythrocytes:
 —, lysed erythrocytes; - - -, 20 µl blood plasma; - ■ -,
 200 µl blood plasma gradient mode of 1.8 to 0 M (NH₄)₂SO₄.

Abbildung 5.3 Trennung von Blutplasma; Fluß: 1.0 ml/min Eluent: 0,02 M NaH₂PO₄, pH=6,8 ; Gradient: 1,8M zu 0M (NH₄)₂SO₄, T=30°C; Trennsäule: Fractogel EMD Phenyl I (S) [24]

Durch den Vergleich der HIC mit der IEX Separation, welche jeweils als zweite Trenndimension nach der Size-Exclusion Chromatographie eingesetzt wurden, konnte eine deutliche Überlegenheit im Bezug auf die Trennleistung für die 60-100 kDa Fraktion der SEC beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.29 Seite 91). Dies ist hierbei durch die Lage der isoelektrischen Punkte von Albumin (67 kDa; PI=5,85^[78]) und Transferrin (72 kDa; PI=5,95^[77]) zu erklären. Aufgrund der geringen Abweichung zwischen den isoelektrischen Punkten und der Ähnlichkeit im Bezug auf das Molekulargewicht besitzen beide Proteine nahezu identische Ladungen. Dies führt dazu, dass ein Ionenaustauscher diese Analyten nur unvollständig voneinander separieren kann (vgl. Abbildung 4.29 Seite 91). Die Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie hingegen, welche eine Trennung aufgrund von unterschiedlichen Hydrophobizitäten durchführt, erlaubt hierbei eine vollständige Trennung von Albumin und Transferrin (vgl. Abbildung 4.29 Seite 91). Dieses Ergebnis konnte durch die MALDI Analytik (Kapitel 4.8) verifiziert werden.

5.3 Elementquantifizierung

Für den Routineeinsatz eines multidimensionalen Trennsystems in der Analytik von Metall-Protein Assoziationen, wie es im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, ist es unerlässlich, eine zuverlässige Quantifizierungsmethode zur Verfügung zu haben.

Hierzu wurde ein neues Verfahren entwickelt (Fast Gradient Calibration), welches eine automatisierte Kalibration der ICP-MS Kopplung erlaubt. Die technische Umsetzung der Kalibrationseinheit (siehe Kapitel 4.5.2) als post-column System reduziert hierbei die Kontamination der HPLC auf ein Minimum. Des weiteren ermöglicht diese Anordnung eine einfache Reinigung der Mischkammer und der Probenschleife, welche während einer laufenden Probenseparation durchgeführt werden kann.

Die Validierungsdaten dieser Technik, welche mit Hilfe von zertifizierten Referenzmaterialien ermittelt wurden, zeigen dass die FGC sowohl für die Gesamtmetallanalytik als auch für den Einsatz in gekoppelten Analysesystemen reproduzierbare und exakte Daten liefert (vgl. Tabelle 4.11 Seite 110). Die Standardabweichung und der Fehler der ermittelten Daten und somit die Genauigkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode ist vergleichbar mit den Ergebnissen, welche mit der klassischen externen Kalibration, welche mit einer internen Standardisierung kombiniert wurde ^[17-21,38-40] oder der Standardaddition ^[38-40] erzielt werden kann. Im Gegensatz zu diesen etablierten Verfahren konnte die Fehleranfälligkeit durch die neue Methode deutlich reduziert werden, da der experimentelle Aufwand durch die Gradientenmessung minimiert wurde und die Datenauswertung weitgehend (R-Script siehe Anhang) automatisiert werden konnte. Aufgrund der hohen Datendichte (~ ca. 9000 Messpunkte) können die Kalibrationsdaten deutlich besser statistisch abgesichert werden. Des weiteren kann hierdurch der Kalibrationsbereich insbesondere bei nicht linearen Detektoren erweitert werden, da die Kalibrationsfunktion nahezu vollständig abgebildet wird ^[66]. Durch den Einsatz einer Entkopplungseinheit (Abbildung 4.24) wurde die Verwendung eines zusätzlichen Flußgradienten ohne Beeinflussung der Zerstäubereffizienz der ICP-MS ermöglicht, wodurch der dynamische Kalibrationsbereich erweitert werden konnte

(vgl. Abbildung 4.26 und 4.27 Seite 86).

Um die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Analyseergebnisse von Realproben nach multidimensionaler chromatographischer Trennung einschätzen zu können, wurden die Daten der Quantifizierung von Blutplasma (Kapitel 4.7) mit Hilfe des Mikrowellendruckaufschlusses verifiziert. Aufgrund der Funktionsweise des Trap-Systems wurden die Wiederfindungsraten, welche zwischen 72 % - 96 % liegen, durch die Addition der Quantifizierungsergebnisse nach der ersten und nach der zweiten Trenndimension, welche parallel ermittelt wurden, bestimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Messfehler durch Metallanreicherungen auf den Chromatographiesäulen keinen Einfluss auf die gewonnenen Daten nehmen. Es ist allerdings davon auszugehen, dass äußerst labile Spezies während der Chromatographie zerfallen können. Durch die Verwendung einer schnelleren Trennung und die Kühlung des HPLC-Systems könnten diese Spezies vermutlich besser analysiert werden.

5.4 2D-HPLC an Blutplasmaproben

Aus der Literatur sind überwiegend eindimensionale Separationsmethoden basierend auf der Size-Exclusion-, Reversed Phase oder Ionenaustauscher-Chromatographie [41,54,56-58] bekannt. Diese beschränken sich auf die Detektion weniger ausgewählter Elemente [8,11,14,15,57,58], was zur Folge hat, dass insbesondere im Rahmen von Metabolismusstudien eventuell vorhandene induzierte Veränderungen des Metallstoffwechsels (z.B. Austauschreaktionen mit essentiellen Elementen) nicht beobachtet werden können. Des weiteren werden hierbei häufig denaturierende Separationsparameter [54,56-58] eingesetzt, was die Gefahr der Artefaktbildung und des Metallverlustes deutlich erhöht (vgl. Kapitel 4.2).

Die mehrdimensionalen Ansätze auf dem Gebiet der chromatographischen Separation von Metall-Protein Assoziationen, welche aus der Literatur bekannt sind, unterliegen den Limitationen der eindimensionalen Techniken und beschränken

sich zudem häufig auf rein qualitative Elementbetrachtungen ^[14,16] oder sie dienen der Identifizierung der Liganden dieser Spezies ^[15] unter Vernachlässigung der Elementinformationen.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen des analytischen Gesamtkonzeptes (vgl. Kapitel 1.1) ein zweidimensionales HPLC-System etabliert, welches zum einen an die Besonderheiten der Metallproteinanalytik angepasst ist (vgl. Kapitel 2.12 und 4.2), des weiteren aber ein Höchstmaß an Flexibilität bietet. Die Detektion der Metall-Protein Assoziationen erfolgte durch die online Kopplung der HPLC mit zwei UV/Vis-Detektoren, welche jeweils nach der ersten und der zweiten Trenndimension in das System integriert wurden. Des weiteren wurde eine online-Kopplung mit einem oder zwei Massenspektrometern mit induktiv gekoppeltem Plasma (vgl. Abbildung 4.8 Seite 60) für die Elementdetektion verwendet.

Im Gegensatz zu früheren Studien ^[8,11,14,15,57,58] konnte durch die Kombination aus einer nativen mehrdimensionalen HPLC-Technik mit der Kollisions/Reaktionszellentechnologie der ICP-MS eine Übersicht der qualitativen und quantitativen Elementverteilung in Humanblutplasma gewonnen werden.

Mit Hilfe dieser Informationen sowie der mittels SEC bestimmten Molekulargewichtsfractionen und dem Vergleich mit Literaturdaten kann hierbei ein Großteil der detektierten Metallproteinspezies wie zum Beispiel für die Elemente Eisen, Kupfer, Nickel und Zink bekannten Metallproteinspezies zugeordnet werden (Tabelle 4.12 Seite 114). Hierbei wurden überwiegend Transport- und Speicherproteine wie Transferrin, Ceruloplasmin und Ferritin detektiert. Aufgrund seiner relativen Häufigkeit (52-68 %)^[50] und der Möglichkeit neben koordinativen Bindungen kovalente Bindungen zu Metallen mit Hilfe einer freien Thiolgruppe einzugehen, konnten verschiedene Metall-Protein Assoziationen beobachtet werden, in welchen das Plasmaprotein Albumin als Ligand auftritt. Aus der Literatur ist diese Affinität von Albumin zu verschiedensten Metallen gut bekannt ^[23,45,50,52,54,57,58,63]. Des weiteren wurden zahlreiche Metallthionine, welche ebenfalls Metall-Protein Bindungen über eine Thiolgruppe ausbilden, detektiert. Diese Stoffklasse ist aufgrund ihrer Biochemischen Eigenschaften, welche es ihnen erlaubt toxische Elemente wie Cadmium oder Blei zu binden^[45] und sie somit zum einen bioverfügbar zu machen und zum anderen zu transportieren ^[1], analytisch

von besonderem Interesse.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Konzentrationen der potentiellen Analyten im Blutplasma (vgl. Abbildung 2.13 Seite 31) und den unterschiedlichen Metallgehalten (Tabelle 4.12 Seite 114) konnten für einige essentielle und niederabundante Elemente wie Cobalt (0,2 µg/l), Chrom (0,8 mg/l) und Molybdän (0,6µg/l), welche im Rahmen der Gesamtmetallbestimmung detektiert wurden, keine Metall-Protein Assoziationen beobachtet werden. Wenn es die Fragestellung erfordert, kann die Analyse dieser Spezies aber durch eine veränderte Probenvorbereitung ermöglicht werden. Hierbei ist zum einen die Vereinfachung der Probenmatrix zum Beispiel durch die Entfernung von Albumin oder durch Dialyse erfolgversprechend, wenn diese mit einer nachfolgenden Aufkonzentration der verbleibenden Probe einhergeht. Eine weitere Möglichkeit ist die Anpassung der Aquisitionszeit dieser Elemente in der ICP-MS, wodurch eine höhere Sensitivität erreicht werden kann.

Im Gegensatz zu publizierten mehrdimensionalen HPLC-Techniken ^[14-16,17-21] erlaubt das entwickelte HPLC-System den flexiblen Einsatz von unterschiedlichen Trennsystemen in der zweiten Dimension ohne vorherigen Umbau der Anlage. Durch den Einsatz von kompatiblen Eluenten kann das Trennsystem der zweiten Dimension während eines Chromatographielaufes gewechselt werden, was die Verwendung der jeweils optimalen Separationstechnik erlaubt (Abbildung 4.30 Seite 92) und somit zu einer weiteren Verbesserung der Trennleistung führt.

Die hieraus resultierende Reinheit des Analyten ermöglicht weiterhin die Speziation mit Hilfe von massenspektrometrischen Verfahren. Am Beispiel der 60-100 kDa Fraktion konnte die Identifikation unter Verwendung eines MALDI-TOF-MS für Albumin und Transferrin gezeigt werden. Die Untersuchung der Proben aus der 10-20 kDa, 30-50 kDa, 110-250 kDa und der 400-600 kDa Fraktion konnten über das M^+ Signal oder durch den Vergleich mit Standards nicht eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der MALDI-Spektren dieser Fraktionen kann hierbei aber von einer ausreichenden Quantität ausgegangen werden, was die Proteinanalytik mit Hilfe von enzymatischen oder chemischen Verdautechniken ermöglicht. Durch die Anwendung dieser in der Bioanalytik gut etablierten Verfahrensweisen ^[17,20,44,60] könnten charakteristischere MALDI-Spektren erzeugt werden, wodurch die Speziation dieser Analyten mit Hilfe von Proteindatenbanken ermöglicht würde.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Analytik von Metall-Protein Assoziationen ist der Erhalt der Quartär- und Tertiärstruktur dieser Spezies. Der Einsatz von denaturierenden Separationsbedingungen oder der Zusatz von Detergenzien spielt hierbei eine entscheidende Rolle (vgl. Kapitel 4.2). Um Aussagen diesbezüglich treffen zu können, wurde die Nativität der multidimensionalen HPLC-Separation und einer nachfolgenden nativen Gelelektrophoresetechnik anhand eines Modellproteins überprüft (Kapitel 4.9.2). Hierbei konnte exemplarisch für die Alkalische Phosphatase der Erhalt der enzymatischen Aktivität über alle drei Trennschritte nachgewiesen werden (Abbildung 4.56 Seite 119). Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass Denaturierungseffekte und die Artefaktbildung während der Separation durch den Einsatz von schonenden Trenntechniken, weitgehend reduziert werden konnten.

5.5 HPLC-GE Kopplung

Neben den Elementinformationen, welche erfolgreich mit der 2D-HPLC-ICP-MS Kopplung ermittelt werden können (Kapitel 4.6) zeigte sich, dass die Gewinnung von Molekülinformationen mit dieser Technik durch die vorherige Probenaufbereitung mittels Gelelektrophorese (Kapitel 4.8) und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse möglich ist. Des weiteren konnte bei der SDS-PAGE ein erhebliches Trennpotential beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.51 Seite 111), welches neben der Entsalzung der Probe eine weitere Aufreinigung des Analyten ermöglicht. Diese Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Aufgabe einer sehr geringen Probenmenge (5 µl vgl. Kapitel 3.2.4.1) ausreichend ist, um genügend Material für die Proteinidentifizierung zu gewinnen und dieses mit Hilfe von mäßig empfindlichen Färbetechniken wie der Coomassie Färbung (200 - 400 ng/0,5 cm Bande ^[44]) im Gel zu lokalisieren.

In der Biologie ist die Kombination aus HPLC-Separation in Verbindung mit einer nachfolgenden Gelelektrophorese sowohl im Bereich der Proteinsequenzierung als auch

für die semi-präparative Proteinaufreinigung ^[17,23,44,47,60] eine weit verbreitete Vorgehensweise. Hierbei wird die HPLC-Trennung häufig als Vortrennung angesehen, welche lediglich zur Vereinfachung der Probenmatrix dient. Die eigentliche Aufreinigung erfolgt zudem ausschließlich offline mit Hilfe der Gelelektrophorese.

Um die Vorteile einer nachgeschalteten Gelelektrophorese optimal ausnutzen zu können, wurde das Konzept einer online Kopplung von HPLC und GE entwickelt (vgl. Kapitel 1.1). Für die Realisierung dieser online-Kopplung wurde ein Interface (Abbildung 4.54 Seite 116) konstruiert, welches sowohl den Probentransfer als auch die notwendigen Anpassungen des HPLC-Eluenten automatisiert durchführen kann. Die Untersuchung der Nativität des multidimensionalen HPLC-Systems, welche in Kapitel 4.9.2 dargestellt ist, wurde unter Verwendung der HPLC-GE online-Kopplung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl der Probentransfer auf das Gel als auch die Eluentenanpassung an die Bedürfnisse der Gelelektrophorese mit diesem Interface erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Daten der offline Kopplung mit der SDS-PAGE und die Analysen der AP Aktivität lassen darauf schließen, dass die Separation von Metall-Protein Assoziation aus Realproben mit dieser online Methode prinzipiell möglich ist. Aufgrund der komplexen Probenmatrix und dem Fehlen einer geeigneten LA-ICP-MS Methode, welche sowohl die qualitative als auch quantitative Gelanalyse ermöglicht, liegen momentan keine belastbaren Daten für die 2D-HPLC-GE Analytik von Metall-Protein Assoziationen in Realproben vor. Einige erfolgversprechende Ansätze für die Analyse von Gelen oder Blots mit der LA-ICP-MS sind bereits aus der Literatur ^[91-94] bekannt, allerdings beschränken sich diese meist auf qualitative Betrachtungen von Proteinstandards. Aus diesem Grund ist für die Optimierung und Validierung dieser neuen Kopplungstechnik die Entwicklung einer nachweisstarken quantitativen LA-ICP-MS Analytik für die Gelelektrophorese von entscheidender Bedeutung, da die Gelanalytik mit Hilfe von etablierten Färbetechniken keine Aussagen über die Elementverteilung und deren Quantität erlauben. Die Reproduzierbarkeit der durch die Proteinfärbung gewonnenen Daten ist ebenfalls sehr stark von der Erfahrung und Routine des Operators abhängig. Hieraus können sich Probleme im Bezug auf die Aussagekraft dieser Analysen ergeben, was die Methodenoptimierung erschwert. Eine Alternative zu der Metalldetektion im Gel oder Blot mit Hilfe der LA-ICP-MS Technik könnte die direkte Online-Kopplung der Gelelektrophorese mit der ICP-MS, welche bereits aus der Literatur ^{[[95-97]} bekannt ist,

darstellen. Diese Methode könnte im Gegensatz zur LA-ICP-MS problemlos mit etablierten Kalibrationstechniken kombiniert werden. Hierdurch würden sowohl qualitative als auch quantitative Informationen zugänglich. Die Flüssigaufgabe in die ICP-MS ermöglicht hierbei aufgrund der höheren Probentransferrate im Vergleich zur LA-ICP-MS deutlich niedrigere Nachweisgrenzen. Des weiteren kann es erforderlich sein, die Salzfracht, welche durch den Gradienten der zweiten HPLC-Trenndimension variiert, zu homogenisieren und die Detektion der Metall-Protein Assoziation im Gel zu standardisieren, um die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können. Die Entwicklung der LA-ICP-MS Analytik für die Gelelektrophorese und die Optimierung beziehungsweise Validierung dieser neuen Kopplungstechnik wird daher zur Zeit in zwei gesonderten Arbeiten untersucht.

6 Zusammenfassung

Metall-Protein Assoziationen spielen in verschiedensten physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Aufgrund der anspruchsvollen Analytik stehen hierbei insbesondere im Bereich der nicht kovalent gebundenen Metall-Protein-Komplexe nur sehr wenige Analyseverfahren, welche Untersuchungen von unbekannten Metall-Protein Assoziationen ermöglichen, zur Verfügung. Daher wurde ein mehrdimensionales automatisiertes HPLC-System konzipiert, welches den flexiblen Einsatz verschiedener nativer Separationsschritte sowohl im ein- als auch im zweidimensionalen Betrieb ermöglicht. Die entwickelte HPLC-Methode zeichnet sich durch die Möglichkeit aus, eine Vielzahl von Informationen in nur einem Chromatographielauf zu gewinnen. Im Gegensatz zu den aus der Literatur bekannten chromatographischen Trenntechniken [53,54,58,69,77] wurde hier erstmals ein mehrdimensionales HPLC-System etabliert, welches zum einen eine native Proteinseparation von unbekannten Metall-Protein Assoziationen aus humanen Blutplasma erlaubt und gleichzeitig die Möglichkeit der Quantifizierung von Metallen und den Heteroelementen Phosphor und Schwefel bietet. Die induktiv

gekoppelte Plasma Massenspektrometrie ermöglicht hierbei eine äußerst nachweisstarke Multielementdetektion. In komplexen biologischen Matrices wird jedoch der Nachweis vieler Elemente durch isobare molekulare Interferenzen limitiert. Diese Limitierungen können durch den Einsatz der Kollisions/Reaktionszellentechnologie, welche neben der Minimierung von Artefakten ebenfalls die Analyse von stark interferierten Elementmassen wie ^{40}Ca , ^{31}P und $^{32/34}\text{S}$ erlaubt, weitgehend aufgehoben werden.

Des weiteren wurde die Kalibration der ICP-MS durch die Etablierung einer neuen schnellen Gradientenkalibration (FGC), sowohl im Bezug auf die Kalibrationszeit als auch die statistische Absicherung der Daten optimiert. Dieses Kalibrationssystem wurde anhand von zertifizierten Referenzmaterialien validiert und in das multidimensionale HPLC-System integriert, was ein hohes Maß an Automatisierung ermöglicht. Hierdurch werden stöchiometrische Informationen durch die Bestimmung von Metall/Schwefel- und Metall/Phosphorverhältnissen zugänglich.

Durch die Verwendung von präparierten Trennsäulen in der zweiten Trenndimension und im Trap-System konnten die Säulendimensionen an die Bedürfnisse der Anlage angepasst werden. Die Experimente zur Charakterisierung des Trap-Systems zeigten hierbei eine reproduzierbare Qualität bei der Präparation der Säulen. Des weiteren wurde eine Abhängigkeit der Trapeffektivität vom isoelektrischen Punkt der Analyten beobachtet.

Die Kombination der qualitativen und quantitativen ICP-MS Daten und die Masseninformation, welche mit Hilfe der SEC gewonnenen wurden, ermöglichen den Vergleich mit Literaturdaten, was bei der Analyse von Blutplasma zu zahlreichen Übereinstimmungen geführt hat und somit Rückschlüsse auf die Metall- und Proteinverteilung im Blutplasma erlaubt. Des weiteren konnten einzelne Metall-Protein Assoziationen mit Hilfe der MALDI-Analytik über das M^+ Signal und den Vergleich mit Standards identifiziert werden. Die Anwendung von Verdautechniken kann hierbei weitere Möglichkeiten zur Identifikation eröffnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine neue Methode zur online Kopplung von HPLC-Systemen mit der Gelelektrophorese eingesetzt, um die Nativität des nunmehr dreidimensionalen Trennsystems zu untersuchen. Durch den Einsatz des hierfür entwickelten HPLC-GE Interface, welches den Probentransfer auf das Gel und die Modifikation des HPLC Eluenten ermöglicht, der nachfolgenden Gelelektrophorese und des abschließenden Tests, konnte der Erhalt der enzymatischen Aktivität exemplarisch für

ein Metallprotein (Alkalische Phosphatase, Kalb) nach der Separation bestätigt werden.

Mit Hilfe der online-Kopplung von HPLC und Gelelektrophorese wird die mehrdimensionale HPLC, nach vorangegangener Entwicklungsarbeit (vgl. Kapitel 5.5), um eine weitere leistungsstarke Trenndimension erweitert werden können.

Die hohe Flexibilität des multidimensionalen HPLC-Systems, die erreichte Trennleistung mit der Option der massenspektrometrischen Speziation und der Erhalt der enzymatischen Aktivität während der gesamten Separation ermöglichen in Kombination mit der qualitativen und quantitativen Elementinformation die Analyse von unbekannten Metall-Protein Assoziationen in komplexen biologischen Matrices. Des weiteren kann das hier vorgestellte 2D-HPLC-System durch einfachen Säulentauch an speziellere Problemstellungen wie zum Beispiel die Metallthioninanalytik angepasst werden.

7 Ausblick

Der Einsatz von multidimensionalen Trenntechniken bietet vielfältige Möglichkeiten zur Analyse der Metall- und der Proteinverteilung in biologischen Proben. Insbesondere durch die Kombination mit der nachweisstarken Multielementdetektion der induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie können hierbei vielfältige Informationen gewonnen werden. Dies kann insbesondere im Rahmen von Metabolismusstudien zu wertvollen Erkenntnissen über die Toxizität von Metallen und ihren Transport durch den Organismus führen.

Durch die Erweiterung der nativen 2D-HPLC auf Gewebeextrakte sind hierbei Untersuchungen von toxischen Elementen denkbar, welche im Verdacht steht biologische Schutzmechanismen wie die Bluthirnschranke oder die Plazenta durch molekulare Mimikry^[98] zu durchbrechen. Hierbei assoziieren sie an Biomoleküle, welche diese Schranken passieren können, was dazu führt, dass diese Elemente wie ein „blinder Passagier“ die Eigenschaften des jeweiligen Bindungspartners für den Transport nutzen kann. Zur Analyse der organischen Anteile der Metall-Protein Assoziationen ist die simultane Kopplung des Systems mit einem elementsensitiven Detektor wie der ICP-MS und einem

hochauflösenden Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS), welches auch die Möglichkeit von MS/MS bereitstellt, anzustreben. Hierdurch könnte zum einen eine sensitivere Detektion der Liganden, als sie die UV/Vis-Spektrometrie erlaubt, realisiert werden, was niederabundante Spezies für diese Analytik zugänglich machen würde. Zum anderen wäre eine direkte Identifizierung durch die MS/MS Technik möglich. Diese online-Kopplung könnte analog zu bekannten Verfahren wie die GC-EI/ICP-MS ^[85] oder der eindimensionalen LC-MS ^[93-97], mit einem einfachen Splitter realisiert werden. Die offline-Speziation durch die Anwendung der organischen Massenspektrometrie kann durch den Einsatz von bioanalytischen Techniken aus der klassischen Proteomics, wie zum Beispiel dem Trypsinverdau ergänzt werden.

Die Identifikation der organischen Liganden durch den vorgestellten Analyseweg könnte in Kombination mit den Elementinformationen zu besseren Behandlungsmöglichkeiten bei Metallvergiftungen führen und die Anwendung von metallhaltigen Arzneien, wie sie zum Beispiel in der Krebstherapie (cis-Platin) ^[100,101] oder zur Behandlung von Magengeschwüren (Bi-Citrat) ^[102-104], eingesetzt werden, verbessern. Des weiteren könnte das Verständnis dieser Transportprozesse die Entwicklung von differenzierten Vorhersagemodellen für die Bioverfügbarkeit von Metallen in höher entwickelten Organismen erlauben.

Die Technik der online-Kopplung von HPLC und Gelelektrophorese eröffnet nicht nur für die Separation von Metall-Protein Assoziationen neue Einsatzmöglichkeiten von multidimensionalen Trennsystemen. Wenn diese Technik für die Analyse von Realproben optimiert und validiert ist (vgl. Kapitel 5.5), kann diese sowohl für die semi-präparative Proteinaufreinigungen als auch für die native Separation im Bereich der Bioanalytik ein weites Anwendungsfeld finden.

8 Literatur

- [1] M.Nordberg, „*Metallothioneins: historical review and state of knowledge*"; Talanta,46, 243-254**1998**.
- [2] J.S. Garcia, C.S. de Magalhaes, M.A.Z. Arruda, „*Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*" ;Talanta, 69, 1-15, **2006**.
- [3] V.I. Barnov , Z.A. Quinn, „*The potential for elemental analysis in biotechnology*"; J. Anal. At. Spectrom.,17, 1148-1152, **2002**.
- [4] S.A. Berkowitz, „*Protein purification by multidimensional liquid chromatography*"; Adv. Chromatogr., 29, 175-219, **1989**.
- [5] D.F. Samain, „*Multidimensional chromatography in biotechnology*" ; Adv. Chromatogr., 29, 77-132, **1989**.
- [6] J. M. Sanchez , R.D. Sacks, „*Development of a Multibed Sorption Trap, Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, and Time-of-Flight Mass Spectrometry System for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Human Breath*"; 78,3046-3054, Anal.Chem., **2006**.
- [7] A.Polatajko, B.Banas, J.Szpunar, „*Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC–ICP MS.*"; Anal.Bioanal.Chem., 381, 844-849, **2005**.
- [8] V. Gergely, M. Montes-Bayon, P. Fodor, , A. Sanz-Medel, „*Selenium species in aqueous extracts of alfalfa sprouts by two-dimensional liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass Spectrometry detection*"; J. Agr.Chem. 54, (13), 4524-4530, **2006**.

- [9] J.C. Venkatramani, Y.Zelechonok., „*An Automated Orthogonal Two-Dimensional Liquid Chromatograph*“, Anal.Chem., 75:3484-3494, **2003**.
- [10] K. Wagner, R. Bischoff, , K.K. Unger, „*An Automated On-Line Multidimensional HPLC System for Protein and Peptide Mapping with Integrated Sample Preparation*“, Anal.Chem., 74, 809-820, **2002**.
- [11] M. Sulyk, S. Hann, G. Koellensperger, , G. Stingeder, „*Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins*“, J. Anal. At. Spectrom., 20, 856-863, **2005**.
- [12] J. Masuda, D.M. Maynard, M. Nishimura, T. Ueda, J. A. Kowalak , S.P. Markey, „*Fully automated micro- and nanoscale one- or two- dimensional high-performance liquid chromatography system for liquid chromatography-mass spectrometry compatible with non-volatile salts for ion exchange chromatography*“, J. Chromatogr. A, 1063, 57-69, **2005**.
- [13] N.C. Coldham , M.J. Woodward, „*Characterization of the Salmonella Typhimurium Proteome by Semi-automated Two Dimensional HPLC-Mass Spectrometry: Detection of Proteins Implicated in Multiple Antibiotic Resistance*“, J. Prot. Res., 3, 595-603, **2004**.
- [14] P. Bouysseire, E. Denkhaus, , A. Prange, „*Analysis of nickel species in cytosols of normal and malignant human colonic tissues using two dimensional liquid chromatography with ICP-sector field MS detection*“, J. Anal. At. Spectrom., 19, 196-200, **2004**.
- [15] S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, „*Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection*“, Analyst, 127, 223-229, **2002**.

- [16] S. McSheehy, J. Szpunar, „*Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection*“; *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, 79-87, **2002**.
- [17] Lottspeich, Engels, „*Bioanalytik*“ ; 2. Auflage, Elsevier, **2006**.
- [18] M.H.Gey, „*Instrumentelle Bioanalytik*“; Vieweg, Braunschweig, **1998**.
- [19] M.Kastner, „*Protein liquid chromatography*“, Elsevier, **2000**.
- [20] W.D. Lehmann, „*Massenspektrometrie in der Biochemie*“; Spektrum, Heidelberg **1996**.
- [21] V. Meyer, „*Praxis der Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie*“; 3. Auflage, Sauerländer, Frankfurt, **1984**.
- [22] „*CD Römpp Chemie Lexikon*“ ; Thieme, Stuttgart, New York, **1995**.
- [23] Lehninge, Nelson , Cox, „*Biochemie*“; Springer, Berlin, **2001**.
- [24] K. Pomazal, C. Prohaska , Steffan, „Hydrophobic interaction chromatographic separation of proteins in human blood fractions hyphenated to atomic spectrometry as detector of essential elements.“; *J. Chromatogr. A*, 960, 143-150. **2002**.
- [25] F. Hofmeister, „*Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mitteilung. über Regelmässigkeiten in der Eiweiß fällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben.*“ ; *Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.*, 24, 247-260. **1888**.
- [26] R. J. Laub , J. I. Purnell, „*Criteja for the use of Mixed Solvents in Gas- Liquid Chromatography*“, *J. Chromatogr.*, 112, 1-79, **1975**.
- [27] M. McCann, H. Purnell , C.A. Wellington, „*Mixed-solvent Theory for Liquid Chromatography*“, *Faraday*, 85-91, **1980**.

- [28] E.D. Katz, K. Ogan , R.P.W. Scott, „*Distribution of a Solute between two Phases: The Basic Theory and its Application to the Prediction of chromatographic retention*“; J. Chromatogr., 352, 67-90, **1986**.
- [29] B. D. Hames , D. Rickwood, „*Gel Electrophoresis of Proteins: a practical approach*“; IRL Press Limited, London, Washington DC, **1981**.
- [30] R. Westermeier, „*Elektrophorese-Praktikum*“; VCH, Weinheim, **1990**.
- [31] H.R. Maurer, „*Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*“; de Gruyter, Berlin, New York, **1971**.
- [32] H. Schägger , G. von Jagow, „*Blue Native electrophoresis for isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form*“; Anal.Biochem.,199, 223-231, **1991**.
- [33] N. Käntsch, P. Lienemann, P. Richter , H. Vonmont, „*Elementanalytik Instrumenteller Nachweis und Bestimmung von Elementen und deren Verbindungen*“; Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [34] T. Yamada, N. Yamada, „*Operating Principles of Agilent Octopole Reaction Cell*“; 13, Agilent ICP-MS Journal, **2002**.
- [35] D.R. Bandura , L. Liao. „*Characterization of phosphorus content of biological samples by ICP-DRC-MS: potential tool for cancer research*“; J. Anal. At. Spectrom., 19, 96-100, **2003**.
- [36] M. Mann, R.C. Hendrikson , A. Pandey, „*Analysis of Proteins and Proteons by Mass Spectrometry*“; A. rev.biochem., 70, 437-473, **2001**.
- [37] Y.F. Li, C.Y. Chen, B. Li, J. Sun, J.X. Wang, Y.X. Gao, Y.L. Zhao , Z.F. Chai, „*Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS*“ ; J. Anal. At. Spectrom., 21, 94-96, **2006**.

- [38] R. Keller, J-M. Mermet , M. Otto, „*Analytical Chemistry*“; VCH, Weinheim, **2004**.
- [39] S.N. Nelms, „*ICP Mass Spectrometry Handbook*“; CRC, Oxford, **2005**.
- [40] D. Harvey, „*Modern Analytical Chemistry*“; McGraw-Hill, Boston, **2004**.
- [41] H.G. Infante, K. van Campenhout , F.C. Adams, „*Multi-element speciation of metalloproteins in fish tissue size-exclusion chromatography coupled "on-line" with ICP-isotope dilution-time-of-flight-mass spectrometry*“; Analyst, 128, 651-657, **2003**.
- [42] J.Feldmann, „*Summary of Calibration Method for the Determination of Volatile Metal(loid) Compounds in Environmental Gas Samples by using Gas Chromatography-Inductively coupled plasma mass spectrometry*“; J. Anal. At. Spectrom., 12, 1069-1076, **1997**.
- [43] J, Szpunar , R. Lobinski, „*Hyphenated techniques in Speciation Analysis*“; Berlin, Springer, **2004**.
- [44] H. Rehm, „*Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*“; Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **2002**.
- [45] S.J. Lippard , J.M. Berg, „*Bioanorganische Chemie*“; Spektrum, Heidelberg, **1995**.
- [46] Hollemann , Wiberg, „*Lehrbuch der Anorganischen Chemie*“; de Gryter, Berlin, New York **1995**.
- [47] Lubert , Stryer, „*Biochemie*“; Spektrum, Heidelberg, **1991**.
- [48] C. Eschenbroich , A. Salzer, „*Organometallchemie*“; Teubner, Stuttgart, **1983**.
- [49] E. Riedel, „*Anorganische Chemie*“; de Gryter, Berlin, New York, **1994**.
- [50] Begemann , Rastetter, „*Klinische Hämatologie*“; Springer, Berlin, **1986**.

- [51] N.L. Anderson , N.G. Anderson. *"The Human Plasma Proteome"*; Molecular & Cellular Proteomics, 1 , 845-867, **2002**.
- [52] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón , M. L. Fernández Sánchez, *„Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics"*; Anal. Bioanal. Chem., 377,236-247, **2003**.
- [53] M. B. de la Calle Guntinas , G. Bordin , A. R. Rodriguez, *„Identification, characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography"*; Anal. Bioanal. Chem., 374, 369-378, **2002**.
- [54] A. Raab, P. Brätter, *„Separation of metalloprotein complexes in serum by Size-exclusion chromatography Optimisation of the separation parameters retention behaviour and recovery employing radiotracers"*; J.Chromatogr. B, 707, 17-24, **1997**.
- [55] E. Unsal, S.T. Camli, S.Senel , A.Tuncel, *„Chromatographic performance of monodisperse-macroporous particles produced by "modified seeded polymerization" I: Effect of monomer/seed latex ratio"*; J. App. Poly. Sci., 92, 607-618, **2004**.
- [56] E. Varlet-Marie, M. Ashenden , M. Audran, *"Detection of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers in Human Serum for Doping Analysis:Confirmation by Size-Exclusion HPLC"*; Clinical Chemistry, 50, 723-731, **2004**.
- [57] K. Inagaki, N. Mikuriya , S. Morita, *„Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pre-treatment and inductively coupled plasma mass spectrometry"*; Analyst, 125, 197-203, **2000**.

- [58] K. Pomazal, C. Prohaska, I. Steffan , G. Reich, „*Determination of Cu,Fe,Mn and Zn in blood fractions by SEC-HPLC-ICP-AES coupling*“; J.Chromatogr. A, 124, 657-663, **1999**.
- [59] M.M. Bradford, „*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*“; Anal. Biochem., 72, 248-254. **1976**.
- [60] M.P. Deutscher, „*Guide to Protein Purification*“; Academic Press INC., New York, Bosten, **1990**.
- [61] J.Toffel, „Vergleich verschiedener Trennverfahren in Hinblick auf die Analyse von Metallproteinen“; Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen **2006**.
- [62] T.W. May , R.H. Wiedmeyer, „*A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS*“; At.Spectrosc., 15, 150-154, **1998**.
- [63] F.Hasenäcker, „*Analyse von Metallproteinen mittels HPLC-ICP-MS*“; Diplomarbeit, Duisburg-Universität Essen **2005**.
- [64] S. Kromidas, U. Gruber , W. Klein, „*Praxis der instrumentellen Analytik - Validierung in der Analytik*“; VCH, Weinheim, New York, **2003**.
- [65] M. Bearns, H. Hoffmann , A. Renken, „*Chemische Reaktionstechnik Lehrbuch der Technischen Chemie*“; VCH, Weinheim, **1999**.
- [66] F. Hasenäcker , A. V. Hirner, „*Validation of a fast semi-automated gradient calibration system for ICP-MS quantification of trace elements*“ ; J. Anal. At. Spectrom., 22, 175-178, **2007**.
- [67] M.Jakubith, „*Chemische Verfahrenstechnik*“; VCH, Weinheim, **1991**.

- [68] R.A.Diaz-Bone, „*Untersuchung metall(oid)organischer Verbindungen nach biologischer Abfallbehandlung mittels einer neu entwickelten GC-ICP-MS-Methode*“; Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2006**.
- [69] K. van Campenhout, H.G. Infante, , R. Blust, „*Induction and Binding of Cd, Cu, and Zn to Metallothionein in Carp (Cyprinus carpio) Using HPLC-ICP-TOFMS*“; Toxicol. Sci., 80, 276-287, **2004**.
- [70] W. Maret , B.L. Vallee, „*The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase.*“; Biochem., 95, 3483-3488, **1998**.
- [71] RCSB-Proteindatenbank <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>
- [72] Swiss-Prot Datenbank <http://www.expasy.org/>
- [73] Mascot- Proteindatenbank http://www.matrixscience.com/search_form_select.html
- [74] J.Wang, R.S.Houk, D.Dreessen, D.R.Wiederin,„*Identification of Inorganic Elements in Proteins in Human Serum and in DNA Fragments by Size Exclusion Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with a Magnetic Sector Mass Spectrometer*“; J.Am.Chem.Soc.. 120, 5793-5799, **1998**.
- [75] S.E. Brien, B.W. Acon , A. Montaser, „*Reduction of molecular ion interferences with hexapole collision cell in direct injection nebulization-inductively coupled plasma mass spectrometry*“; J. Anal. At. Spectrom., 18, 230-238, **2003**.
- [76] S. Hann, G. Koellensperger , G. Stingeder, „*SEC-ICP-DRCMS and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins*“; J. Anal. At. Spectrom., 19, 74-79, **2004**.

- [77] E. McCurdy , G. Woods, „*The application of collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry to multi-element analysis in variable sample matrices, using He as a non-reactive cell gas.*“; J. Anal. At. Spectrom. 19, 607-615, **2004**.
- [78] P.G. Righrtti , T. Caravaggio, „*Isoelectric points and molecular weights of proteins*“; J.Chromatogr. 127, 1-28, **1976**.
- [80] K.Pomazal,C.Prohaska,I.Steffan,G.Reich,J.F.K.Huber, „*Determination of Cu, Fe, Mn and Zn in blood fractins by SEC-HPLC-ICP-AES coupling*“; Analyst, 124,657-663, **1999**.
- [81] R.Lobinski,H.Chassaigne, J.Szpunar, „*Analysis for metallothioneins using coupled techniques*“; Talanta, 46, 271-289, **1998**.
- [82] C.S.Muniz,J.M. Marchante Gayon, A.Sanz-Medel, „*Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS*“; J. Anal. At. Spectrom.,16,587-592, **2001**.
- [83] L. A. A.E. Sluyterman,O. Elgersma, „*Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on ion-exchange colums I. General Principels*“; J.Cromatogr.,150, 17-30, **1978**.

- [84] L. A. A.E. Sluyterman, O. Elgersma, „*Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on ion-exchange columns II. Experimental Verification*“; J. Chromatogr., 150, 31-44, **1978**.
- [85] J. Koesters, J. Hippler, R. A. Diaz-Bone, A. V. Hirner, „*Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds.*“; J. Anal. At. Spectrom., 20, 996-999, **2005**.
- [86] K.G. Fernandez, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Mendel, „*Complementary FPLC-ICP-MS and MALDI-TOF for studying vanadium association to human serum proteins.*“; J. Anal. At. Spectrom., 20, 210-215, **2005**.
- [87] M. Wind, W.D. Lehmann, „*Element and molecular mass spectrometry-an emerging analytical dream team in the life sciences*“; J. Anal. At. Spectrom., 19, 20-25, **2004**.
- [88] J. Masuda, D. M. Maynard, M. Nishimura, T. Ueda, J. A. Kowalak, S. P. Markey, „*Fully automated micro- and nanoscale one- or two-dimensional high-performance liquid chromatography system for liquid chromatography-mass spectrometry compatible with non-volatile salts for ion exchange chromatography*“; J. Chromatogr. A, 1063, 57-69, **2005**.
- [89] M.E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Mendel, „*Strategies To Study Human Serum Transferrin Isoforms Using Integrated Liquid Chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF Detection: Application to Chronic Alcohol Abuse*“; Anal. Chem., 77, 5615-5621, **2005**.

- [90] H.G. Infante, K. van Campenhout, R. Blust , F.C. Adams, „*Inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography for multi-elemental speciation analysis of metalloproteins in carp cytosols*“; J. Anal. At. Spectrom., 17, 79-87, **2001**.
- [91] S.D. Muller, R.A. Diaz-Bone, J. Felix , W. Goedecke, "*Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies*"; J. Anal. At. Spectrom., 20, 907-911, **2005**.
- [92] J. Felix, R.A. Diaz-Bone, A.V. Hirner, „*Comparative determination of protein bound metal(loid)s in human blood by native vs. denaturing gel electrophoresis coupled with LA-ICP-MS*“; Book of abstracts of the European Winter Plasma Conference on Plasma Spectrochemistry, **2005**.
- [93] R. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson , R.K. Poole, „*Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry*“; Electrophoresis, 25, 2469–2477, **2004**.
- [94] I. Feldmann, C.U. Koehler, P.H. Roosb , N. Jakubowski, „*Optimisation of a laser ablation cell for detection of hetero-elements in proteins blotted onto membranes by use of inductively coupled plasma mass spectrometry*“; J. Anal. At. Spectrom., 21, 1006–1015, **2006**.
- [95] M.Garijo Añorbe, J.Messerschmidt, I.Feldmann, N.Jakubowski, „*On-line coupling of gel electrophoresis (GE) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the detection of Fe in metalloproteins*“; J. Anal. At. Spectrom., 8, 917-924, **2007**.

- [96] V.L.Elliott, C.W.McLeod, P.S.Marshall, „*Combination of gel electrophoresis and ICP-mass spectrometry - novel strategies for phosphoprotein measurement*“, *Anal.Bioanal.Chem*, 383 , 416-423, **2005**.
- [97] W.Bruchert, A.Helfrich, N.Zinn, „*Gel electrophoresis coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry using species-specific isotope dilution for iodide and iodate determination in aerosols*“, *Anal.Chem*, 79, 714-1719, **2007**.
- [98] C. C. Bridges, R. K. Zalups, „*Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals*“, *Tox. App. Pharmacol.*, 131-165, **2004**.
- [99] D. G. Sar, M. Montes-Bayon, E. B. Gonzalez, A. Sanz-Medel, „*Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry*“, *J. Anal. At. Spectrom.J*, 21,861-868, **2006**.
- [100] D. Esteban-Fernandez, M. Montes-Bayon, E. Blanco Gonzalez, M. M. Gomez, M. A. Palacios, A. Sanz-Medel, „*Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins*“, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, 378, **2008**.
- [101] H.Sun, H.Li, P.J.Sandler, „*Interactions of Bismuth Complexes with Metallothionein(II)*“, *J. Bio.Chem.*, 274, 29094-29101, **1999**.
- [102] J.Pablo, V.M.Mota, M.R.Fernandes de la Campa, A.Sanz-Medel, „*Merging zones flow injection for the determination of ultratraces of bismuth by volatile species generation atomic absorption spectrometry using sodium tetraethylborate(III)*“, *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, 431-435, **1998**.

- [103] N.Burford, D.E.Mahony, M.Morash, „*Definitive identification of cysteine and glutathione complexes of bismuth by mass spectrometry: assessing the biochemical fate of bismuth pharmaceutical agents*“, Chem.Comm., 146-147, **2003**.

- [104] P.J.Sandler, H.Li, H.Sun, „ Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth“; C. Chem. Rev., 689-709, 1999.

9 Abkürzungen

Tabelle 9.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AEX	Anionenaustauscherchromatographie
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CEX	Kationenaustauscher Chromatographie
CRC	Collision Reaction cell
CSTR	idealer kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor
DRC	Dynamic Reaction Cell
ESI	Elektrospray Ionisation
FDGC	Fast Double Gradient Calibration
FGC	Fast Gradient Calibration
GE	Gelelektrophorese
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
ICP-MS	Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometer
IEX	Ionenaustauscher (Anionen & Kationen) Chromatographie
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
n.n	nicht nachweisbar
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NP	Normalphasen Chromatographie
ORC	Oktupol Reaction Cell
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PI	isoelektrischer Punkt
POM	Polyoxymethylen
RP	Reversed Phase Chromatography
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
TOF	Time of flight

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Analytisches Konzept zur multidimensionalen Analytik von Metall-Protein Assoziationen	2
Abbildung 2.1 Übersicht Trennsysteme und Trennleistung in der Proteinanalytik [17]	5
Abbildung 2.2 schematische Darstellung einer HPLC - Apparatur [22]	7
Abbildung 2.3 Funktionsweise der Size-Exclusion Chromatographie [23]	8
Abbildung 2.4 Funktionsweise der hydrophoben Interaktions-Chromatographie [18]	9
Abbildung 2.5 Funktionsweise der Ionenaustauscher Chromatographie [18]	11
Abbildung 2.6 pH-Abhängigkeit der Ionenaustauscher Chromatographie [18]	11
Abbildung 2.7 Funktionsprinzip der Gelelektrophorese [17]	14
Abbildung 2.8 Aufbau einer ICP-MS [33]	15
Abbildung 2.9 Bindungsmöglichkeiten von Metallionen an Aminosäuren [45]	21
Abbildung 2.10 Metallzentrum des Hämoglobin	22
Abbildung 2.11 Ligandenfeldaufspaltung im tetraedrischen Ligandenfeld [49]	26
Abbildung 2.12 Ligandenfeldaufspaltung im oktaedrischen Ligandenfeld [49]	27
Abbildung 2.13 Proteinverteilung im Blutplasma [51]	30
Abbildung 3.1 Aufbau zur Säulen-Präparation	41
Abbildung 3.2 Mechanismus der AP-katalysierten Farbreaktion	46
Abbildung 4.1 P(-), PO(-) und UV- Chromatogramm (-) von Blutplasma Fluß: 0.30 ml/min Eluent: Citratpuffer pH 7.2 , 0.04 M , Trennsäule: Tricorn Superdex 200 10/300 GL	49
Abbildung 4.2 S(-), SO(-) und UV- Chromatogramm (-) von Blutplasma ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	50

Abbildung 4.3 ICP-MS Signal der membranfreien Zellfraktion von Eisen(--) und Germanium (--); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	51
Abbildung 4.4 UV- Chromatogramme von Blutplasma mit unterschiedlichen EDTA Konzentrationen; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	54
Abbildung 4.5 Cu(-) Referenz- und Cu(-) Chromatogramm mit EDTA Zusatz einer Plasmaprobe ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	55
Abbildung 4.6 Vergleich der UV- Chromatogramme von Blutplasma mit SDS (-) Zusatz, SDS und Hitzedanaturiert (-) sowie einer Referenzprobe (-) ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	56
Abbildung 4.7 Vergleich der Cu Massenspur von Blutplasma mit SDS (-) Zusatz, SDS und Hitzedanaturiert (-) sowie einer Referenzprobe (-) ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.1	57
Abbildung 4.8 schematischer Aufbau der multidimensionalen HPLC	59
Abbildung 4.9 Kalibrationskurve verschiedener Proteinstandards und deren Standardabweichung; Fluß: 0.30 ml/min Eluent: Citratpuffer pH 7.4 , 0.04 M , Trennsäule: Tricorn Superdex 200 10/300 GL	61
Abbildung 4.10 UV-Chromatogramm von Blutplasma (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9	62
Abbildung 4.11 Optimierung der AEX (Hamilton PRP-X100; 2,1mm x 50mm) für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.2	64
Abbildung 4.12 Optimierung der HIC (Resorce Phenyl; 2,1mm x 50mm) für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.3	65
Abbildung 4.13 Optimierung der IEX für Blutplasma; chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.4.4	67
Abbildung 4.14 Trap-Effektivität in Abhängigkeit vom PI des Analyten	69

Abbildung 4.15 Versuchsaufbau externe Kalibration	70
Abbildung 4.16 Aufbau FGC Basissystem [66]	71
Abbildung 4.17 Aufbau FGC/FDGC-HPLC	74
Abbildung 4.18 FGC-Mischzelle	75
Abbildung 4.19 theoretischer Konzentrationsverlauf der FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 500 µg/l)	77
Abbildung 4.20 experimenteller Konzentrationsverlauf der FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 500 µg/l)	77
Abbildung 4.21 Kalibrationsfunktion FGC (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,25 ml/min, Standardkonzentration: 350 µg/l)	78
Abbildung 4.22 Vergleich externe Kalibration und FGC Methode	79
Abbildung 4.23 UV-Chromatogram von Blut (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9	81
Abbildung 4.24 Aufbau Flußentkoppler	83
Abbildung 4.25 Vergleich der Signalintensitäten von Cu bei konstanter Konzentration und variierenden (0,05 ml/min ²) Fluß mit (-) und ohne (-) Entkoppler	84
Abbildung 4.26 FGC Kalibrationsfunktion (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,30 ml/min, Standardkonzentration: 1000 µg/l)	85
Abbildung 4.27 FDGC Kalibrationsfunktion (Zellvolumen: 1,003 ml, Fluß: 0,1 ml/min Steigerung: 0,05 ml/min ² Standardkonzentration: 1000 µg/l)	85
Abbildung 4.28 Ausschnitt der UV (-) und ICP-MS Chromatogramme der Albumin Fraktion von Nickel (-) und Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9	89
Abbildung 4.29 2D-HPLC Separation von Blutplasma; Links erste Dimension SEC von Plasma ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9; Rechts Vergleich IEX und HIC Separation in der zweiten Dimension chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 3.4.4 & 3.4.5	90

- Abbildung 4.30 2D-HPLC Separation von Blutplasma; Links erste Dimension SEC von Plasma ; chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.9; Rechts IEX und HIC Separation in der zweiten Dimension chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 4.6 91
- Abbildung 4.31 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 92
- Abbildung 4.32 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfe (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 93
- Abbildung 4.33 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Zink (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 94
- Abbildung 4.34 UV-Chromatogramm 60-100 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 94
- Abbildung 4.35 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Magnesium (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 95
- Abbildung 4.36 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Eisen (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 96
- Abbildung 4.37 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 97
- Abbildung 4.38 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30 98
- Abbildung 4.39 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS

Signal von Zink (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	98
Abbildung 4.40 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	99
Abbildung 4.41 UV-Chromatogramm 10-20 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	100
Abbildung 4.42 UV-Chromatogramm 30-50 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	101
Abbildung 4.43 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Kupfer (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	102
Abbildung 4.44 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	102
Abbildung 4.45 UV-Chromatogramm 110-250 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	103
Abbildung 4.46 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Eisen (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	104
Abbildung 4.47 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Nickel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	105
Abbildung 4.48 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Zinn (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	105

Abbildung 4.49 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Phosphor (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	106
Abbildung 4.50 UV-Chromatogramm 400-600 kDa Fraktion vom Plasma (-) und ICP-MS Signal von Schwefel (-); chromatographische Bedingungen siehe Abbildung 4.30	107
Abbildung 4.51 SDS-Gel (10%) für die MALDI Analytik	110
Abbildung 4.52 MALDI-Spektrum HSA-Standard (-) und HSA (-) aus Blutplasma	111
Abbildung 4.53 MALDI-Spektrum Transferrin (-) aus Blutplasma	112
Abbildung 4.54 Aufbau HPLC-GE Interface	115
Abbildung 4.55 Einführhilfe HPLC-GE	116
Abbildung 4.56 CN-PAGE von AP nach 3D Separation	118
Abbildung 5.1 Trennung von Blutplasma; Fluß: 1.0 ml/min Eluent: Tris (0.1M;pH 7.4), Trennsäule: TSK G 3000 SW [54]	121
Abbildung 5.2 Vergleich der Wiederfindungsraten nach der 2. Trenndimension	125
Abbildung 5.3 Trennung von Blutplasma; Fluß: 1.0 ml/min Eluent: 0,02 M NaH ₂ PO ₄ , pH=6,8 ; Gradient: 1,8M zu 0M (NH ₄) ₂ SO ₄ , T=30°C: Trennsäule: Fractogel EMD Phenyl I (S) [24]	126

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Hofmeister Serie [18,24]	10
Tabelle 2.2 Übersicht HSAB [45]	24
Tabelle 2.3 elektrophoretische Gruppen Blutplasma [50]	29
Tabelle 3.1 Chemikalien Laufmittel	33
Tabelle 3.2 Sonstige Chemikalien	34
Tabelle 3.3 Instrumentelle Ausstattung HPLC-System	35
Tabelle 3.4 Anionenaustauscherchromatographie Gradient	42
Tabelle 3.5 Mischbettionenaustauscher (IEX) Gradient	43
Tabelle 3.6 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie Gradient	44
Tabelle 4.1 Geräteeinstellungen CRC	48
Tabelle 4.2 Vergleich der CRC-Gasmodi	52
Tabelle 4.3 Kalibration der SEC	61
Tabelle 4.4 Charakterisierung des Trap-Systems	68
Tabelle 4.5 Bestimmung Zellvolumen der FGC-Mischzelle	76
Tabelle 4.6 Validierung der FGC für die Gesamtmetallanalytik	80
Tabelle 4.7 Validierung der FGC für die HPLC-ICP-MS Kopplung	81
Tabelle 4.8 Vergleich der Validierungsdaten für die Gesamtmetallbestimmung mit der FGC und der FDGC	86
Tabelle 4.9 Vergleich der Validierungsdaten für die HPLC mit der FGC und der FDGC	86
Tabelle 4.10 Metallquantifizierung ausgewählter Elemente nach der 1. und 2. Trenndimension	108
Tabelle 4.11 Wiederfindungsraten (Zusammenfassung)	109

Tabelle 4.12 Detektierte Metall-Protein Assoziationen in Humanblutplasma	113
Tabelle 9.1 Abkürzungen	149

12 Anhang

FGC-Auswertungsskript (StatistikProgramm R):

```
#+++++++ Versionsinfo ++++++
rver<-R.Version()
dat<-date()
pver<-"1.0.2 a"

#+++++++ Datenimport ++++++

# Datenverzeichniss

Pfadin="C:/"

File<-dir(path=Pfadin,pattern = "csv",full.names=F)
n<-length(File)

#Exportverzeichniss

Pfadout="C:/"

info<-NULL

# Spaltenüberschriften für den Export

ver<-paste(rver$version.string,"\n","FGC Version ",pver,"\n",dat,"\n","\n")

info<-paste(ver,"Element",",",", "Achsenabschnitt","Fehler","Steigung","Fehler","R^2","\n")

#+++++++
```

Savitzky-Golay Algorithm

#+++++

sav.gol <- function(T, fl, forder=4, dorder=0)

{m <- length(T)

dorder <- dorder + 1

fc <- (fl-1)/2

X <- outer(-fc:fc, 0:forder, FUN="^")

Y <- pinv(X);

T2 <- convolve(T, rev(Y[dorder,]), type="o")

T2 <- T2[(fc+1):(length(T2)-fc)]

pinv <- function (A)

{s <- svd(A)

s\$v %*% diag(1/s\$d) %*% t(s\$u)}

#+++++ Mehrfachimport ++++++

icp<-NULL

for (i in 1:n){

drn<-NULL

Path<-paste(Pfadin,File[i],sep="")

icp <- data.frame(read.csv(Path,header=TRUE,sep=" ",skip=2))

p<-length(icp[,1])-3

icp <- data.frame(read.csv(Path,header=TRUE,sep=" ",nrows=p,skip=2))

if (length(drn)==0) drn<-paste(Pfadout,"Daten_",File[i],sep="") else drn<-NULL

if (length(drn)!=0)dir.create(drn)

dr<-paste(Pfadout,"Daten_",File[i],"/",sep="")

Spaltenanzahl bestimmen


```

s<-length(icp)-1
for (j in 1:s){
  sp<-j+1
  #+++++++ Grenzen setzen ++++++
  cps<-NULL
  t<-icp[,1]/60
  #+++++++ Glätten ++++++

  cps<- sav.gol(icp[,sp],51,dorder=0)
  # Maximum (=ende) setzen
  cps<-cps[0:which.max(cps)]
  t<-t[0:which.max(cps)]
  #Hintergrund & Zeitkorrektur(vorläufig)
  back<-(mean(cps[1:50]))*1.8 #+ 10%
  cps<-cps-back
  cps<-cps[cps>0]
  t<-t[0:length(cps)]
  #+++++++ FGC Rechnung Zeit -> Conz ++++++
  v <- 1.0031
  fluß0 <- 0.1
  flußg <- 0.05
  fluß <- flußg*t+fluß0
  ed.c <- 500
  conz <- ed.c*(1-exp(-(fluß*t)/v))
  #+++++++lineare Regression++++++

```

```

reg <-lm(cps~conz)

inf<-summary(reg)

windows(7,7)

plot(conz,cps,type="l",xlim=c(min(conz),max(conz)),ylim=c(min(cps),max(cps)),xlab="Konz
entration [µg/l]",main=names(icp)[sp],ylab="CPS")

abline(reg,col=2)

plotn<-paste(dr,names(icp)[sp]," Graph",".csv",sep="")

savePlot(filename = plotn,type ="wmf",device = dev.cur(),restoreConsole = TRUE)

#++++++ Datenexport ++++++

if(sp==2)info<-
paste(info,"\n",File[i],"\n",names(icp)[sp],",",inf$coeff[1,1],",",inf$coeff[1,2],",",inf$coeff[2,1],",
",inf$coeff[2,2],",",inf$r.squared,sep="")

info<-
paste(info,"\n",names(icp)[sp],",",inf$coeff[1,1],",",inf$coeff[1,2],",",inf$coeff[2,1],",",inf$coef
f[2,2],",",inf$r.squared,sep="")

if (sp==length(icp)) info<-paste("\n",info,"\n")

kalname<-paste(dr,"Kalibration",".csv",sep="")

write.table(info,file=kalname,sep=",")

info<-NULL

info<-paste(ver,"Element",",", "Achsenabschnitt","Fehler","Steigung","Fehler","R^2","\n")

```

Publikationsliste

- 2007 F. Hasenäcker und A. V. Hirner, *"Validation of a fast semi-automated gradient calibration system for ICP-MS quantification of trace elements"* ; J. Anal. At. Spectrom., 22, 175-178, **2007**.
- 2008 F. Hasenäcker und A. V. Hirner, *"Developement of a fast double gradient calibration system for ICP-MS quantification of trace elements"* ; J. Anal. At. Spectrom., in Vorbereitung, **2008**.
- 2008 F. Hasenäcker und A. V. Hirner, *"Determination of Metall-Protein species in human serum by native 2D-HPLC-ICP-MS"* ; Anal. Bioanal. Chem., in Vorbereitung, **2008**.

Konferenzbeiträge

- 2005 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Budapest, Ungarn, Vortrag: "Analysis of protein-bound metal(loid)s - Comparison of native and denaturing GE-LA-ICP-MS with SEC-ICP-MS"
Vortrag vertreten durch R.A. Diaz-Bone
- 2007 TraceSpec, Münster, Deutschland Vortrag: „Online coupling of 2D-HPLC and CN-PAGE for native separation of Metalloproteins with subsequent detection by LA-ICP-MS

Posterbeiträge

- 2005 Book of abstracts of the European Winter Plasma Conference on Plasma Spectrochemistry, Budapest, Ungarn, Hasenäcker F, Diaz-Bone RA, Hirner AV "Multi-element speciation of protein-bound metals in human blood by SEC-ICP-MS"
- 2005 Metalloproteine und Metalloidproteine, Berlin, Hasenäcker F, Diaz-Bone RA, Hirner AV, "Optimierung der Nachweisstärke der SEC-ICP-MS bei der Multielementanalytik von Humanblut durch den Einsatz der Kollisions-/Reaktionszellentechnologie"
- 2006 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie sowie 20. ICP-MS Anwendertreffen, Mainz, Hasenäcker F, Diaz-Bone RA, Hirner AV, "Optimierung der Nachweisstärke der SEC-ICP-MS bei der Multielementanalytik von Humanblut durch den Einsatz der Kollisions-/Reaktionszellentechnologie"
- 2007 Book of abstracts of the European Winter Plasma Conference on Plasma Spectrochemistry, Taormina, Italien, S. Rabieh, R. A. Diaz-Bone, F. Hasenäcker, J. Koesters, A. V. Hirner, „ Investigation of monomethylarsenous acid (MMAsIII) in brazilian human urine by a combined liquid and gas chromatographic approach"

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Hasenäcker

Anschrift: Am Hackland 6
42551 Velbert

Geburtsdatum: 23.06.1978

Geburtsort: Essen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Kinder: keine

Konfession: ohne

Eltern: Hans-Peter Hasenäcker; Elektromechanikermeister
Erika Hasenäcker; staatl. Erzieherin

Ausbildung

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule Südstr.; Velbert
1988-1997 Gesamtschule Velbert Mitte

Schulabschluss: Abitur 1997 (Durchschnittsnote: 2,3)

Schwerpunktfächer: Deutsch, Englisch, Mathematik, Chemie, Physik, Biologie

Studium: 1997 Chemiestudium Universität Duisburg-Essen bis 2005
02.06.2005 Abschluss Dipl. Chem. (Durchschnittsnote: Gut)

Wehrdienst: November 1998 – August 1999; Fernmelder (IT-Sicherheit Düsseldorf) Dienstgrad: Hauptgefreiter

Fortbildung

Eingeschränkter Sachkundenachweis nach §5 Chemikalien Verbotsordnung

„Qualitätssicherung in der Umwelt-,Lebensmittel und klinischen Analytik“ (EU-Commision Joint Research Center)

„High Resolution Biopolimer Mass Spectrometry “ (Uni-Konstanz)

“Chemische Metrologie und international Maßsysteme – Quo vadis ?“ (EU-Commision Joint Research Center)

Brandschutzunterweisung (Uni-Duisburg-Essen)

Besondere Kenntnisse: in Analytik mit folgenden Techniken: ICP-MS; ESI-MS; MALDI-MS; LA-ICP-MS; 1D/2D-HPLC; GE; Kopplungstechniken, Proteinanalytik, Metallproteinanalytik

IT- Kenntnisse: Programmierung (V-Basic, Java); MS-Office; Open Office; Origin; Statistikprogramm R; DOS, Linux, Windows, Administrator Bundeswehr (IT-Sicherheit)

Sprachkenntnisse: Englisch, Spanisch

Soziale Tätigkeit: Vorstandsmitglied DLRG Langenberg (Management & Weiterbildung) Ausbildungsleiter seit 2000 (Lehrschein Schwimmen/Rettungsschwimmen)

Hobbys: Rettungs und Wettkampfschwimmen (Bezirksmeister 91-93 13. Deutsche Meisterschaft 93), Rettungswachdienst (DLRG), Tauchen (CMAS*), Unterwasserrugby, Elektronik